

---

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## LES PHÉNOMÈNES DE FERMENTATION SONT DES ACTES DE DIGESTION

### NOUVELLE DÉMONSTRATION APPORTÉE PAR L'ÉTUDE DE LA DÉNITRIFICATION DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL

par P. MAZÉ.

#### I

La fermentation alcoolique a été envisagée à l'origine comme une anomalie physiologique.

J'ai montré qu'elle doit être considérée comme un phénomène de digestion. Si les apparences ont permis de la classer dans la catégorie des manifestations pathologiques d'organismes aérobies privés d'air, c'est parce que la levure industrielle, chez laquelle on a développé cette fonction autant qu'on l'a pu, ne se montre pas toujours capable d'assimiler l'alcool qu'elle a produit.

Le nombre de preuves expérimentales accumulées aujourd'hui à l'appui de la conception que j'ai établie est assez imposant pour nous permettre de la considérer désormais comme une notion bien assise.

La démonstration en a été laborieuse à cause des tendances conservatrices de l'esprit qui ne se dégage pas sans effort des traditions ou des questions de sentiment, bien qu'elles n'aient aucun rôle à jouer dans la science expérimentale.

L'alcool offert en excès aux plantes et aux animaux est toxique parce qu'il ne peut circuler à l'état libre dans l'organisme sans produire d'aldéhyde, corps essentiellement nocif.

Cette propriété, dont la constatation est à la portée de tous, a été opposée, sans raison, à des faits probants, car elle ne se manifeste que dans des conditions qui sortent du cadre des démonstrations physiologiques.

Il est bien évident qu'on ne peut pas abuser impunément de l'alcool, parce que l'expérience prouve qu'il est un produit de digestion. L'organisme doit rester maître de ses processus d'assimilation, et tout y est arrangé de façon à ce qu'aucun aliment soluble n'y circule jamais en excès, pas même les sucres, et encore moins les peptones; c'est la condition même de son existence.

Un autre argument susceptible de faire naître un certain flottement dans l'opinion du monde scientifique, c'est la multiplicité des fermentations auxquelles se prêtent les hexoses. Toutes les substances qui en découlent ont reçu la même interprétation fonctionnelle; ce sont des produits gênants pour la cellule qui les forme, impropres par conséquent à l'entretien de sa vie. Quand on établit que l'un d'eux doit être considéré comme un produit de digestion, on ne peut étendre la même conclusion aux autres, à moins de se contenter d'une déduction par analogie. Ce raisonnement a servi sans doute à étayer la première interprétation; mais l'attrait qu'il présente, surtout lorsqu'il comporte des conséquences aussi étendues, ne saurait le justifier d'une façon sérieuse.

Une généralisation légitime ne peut trouver sa raison que dans les faits, et c'est dans le but de parvenir à ce résultat que j'ai entrepris d'étudier une autre fermentation tout aussi importante au point de vue physiologique, la dénitrification.

Considérée dans ses rapports avec l'objet de ce travail, cette question offre sur les fermentations des hexoses l'avantage énorme d'être plus simple, mieux délimitée, et plus facile à suivre au point de vue chimique.

Théoriquement les phénomènes de dénitrification ont trouvé jusqu'ici une interprétation très simple, dans ce fait que l'acide nitrique capable de céder facilement de l'oxygène à des microbes aérobies privés d'air leur permet de se développer dans des conditions d'anaérobiose.

Tous les microbes ne possèdent pas la propriété de réduire l'acide nitrique; la dénitrification, c'est-à-dire la décomposition des nitrates, constitue donc un caractère particulier à un



nombre limité d'espèces microbiennes; elle devient ainsi un facteur de différenciation assez intéressant.

Je me propose de démontrer que cette conception n'attribue pas sa véritable signification à la réduction des nitrates par les microbes; cette fermentation est une conséquence accidentelle de l'assimilation de l'azote nitrique. Le plus souvent, l'acide azotique passe directement à l'état d'ammoniaque sans qu'on puisse mettre en évidence l'existence de corps intermédiaires. La dénitrification révèle leur présence dans quelques cas particuliers et permet ainsi d'affirmer qu'ils existent toujours comme terme de passage.

Pour pousser cette démonstration jusqu'au bout, j'établirai successivement les propositions suivantes, parmi lesquelles la deuxième et la troisième ont été déjà prouvées maintes fois :

1° La réduction des nitrates ne modifie pas la nature des fermentations que produisent les microbes dénitrifiants.

2° La réduction de l'acide nitrique par les ferments anaérobies est due à un dégagement d'hydrogène.

3° Tous les ferments capables de produire de l'hydrogène ne sont pas des ferments dénitrifiants.

4° La réduction des nitrates par les ferments anaérobies producteurs d'hydrogène peut se faire sans formation de termes de passage apparents.

5° Les nitrates entretiennent la vie anaérobie comme la vie aérobie.

6° L'hydrogène de fermentation est l'agent chimique que les anaérobies mettent en œuvre pour assimiler l'azote de l'acide nitrique, le soufre de l'acide sulfurique et peut-être le phosphore de l'acide phosphorique; il est possible que le formène joue le même rôle vis-à-vis de l'acide phosphorique.

7° Les ferments dénitrifiants les plus actifs doivent être considérés comme les mieux adaptés à l'assimilation de l'acide nitrique.

8° Les milieux minéraux que Winogradsky a utilisés pour isoler les ferments nitriques sont aussi des milieux d'élection pour les ferments dénitrifiants.

9° Les *b. dénitrifiants* 1 et 2 (1) conservent leur caractère d'aérobies stricts en présence des nitrates.

(1) V. page 306.

10° Les *b. dénitrifiants* 1 et 2 produisent de l'acide nitreux en milieu minéraux de composition spéciale.

11° Les *b. dénitrifiants* 1 et 2 décomposent les nitrates alcalins au contact de l'air, mais non à l'abri de l'oxygène.

12° Les végétaux supérieurs réduisent les nitrates avec formation d'acide nitreux et de dérivés gazeux de l'acide nitreux dans des conditions particulières.

13° Dans une solution de nitrite de potassium à 1 p. 1.000, les végétaux supérieurs produisent un dégagement d'oxygène dans le vide et à l'obscurité.

14° Les végétaux supérieurs assimilent l'acide nitreux et se développent normalement lorsqu'on le leur offre comme source unique d'azote combiné.

## II

La réduction de l'acide nitrique ne modifie pas la nature des fermentations que produisent les microbes dénitrifiants.

Les microbes capables de décomposer l'acide nitrique avec formation d'acide nitreux sont très nombreux; les plus connus appartiennent à un groupe de bactéries qui produisent de l'hydrogène; ce sont plus particulièrement des ferments propioniques. Le *b. lactis aerogenes*, le *pneumobacille de Friedländer*, les *b. coli* figurent dans ce groupe; ce sont les deux premiers que j'ai utilisés dans mes démonstrations.

Lorsqu'on additionne des cultures de ces deux microbes en bouillon sucré, de 1 p. 1.000 de nitrate de potassium, on voit cesser aussitôt tout dégagement gazeux apparent. On en conclut que les microbes perdent leur propriété de faire fermenter les sucres, parce que les nitrates leur fournissent de l'oxygène et leur permettent de vivre comme des ferments aérobies dont la caractéristique est de produire des combustions totales.

Le *b. lactis aerogenes* et son voisin le *pneumobacille de Friedländer* sont, comme on le sait, des anaérobies facultatifs; quand on admet que les nitrates leur procurent de l'oxygène à l'abri de l'air, et en font des ferments de combustion, on suppose implicitement que les anaérobies facultatifs peuvent réaliser indifféremment des combustions totales en présence



d'oxygène libre ou combiné, ou des fermentations complexes lorsqu'ils en sont privés; mais il ne faut pas oublier que cette affirmation n'a pas reçu de sanction expérimentale. La disparition de l'hydrogène en présence de nitrates semble cependant la confirmer.

L'hydrogène est, en effet, brûlé par l'oxygène de l'acide nitrique, et il est permis de supposer que tous les produits de la fermentation subissent le même sort, ce qui revient à dire qu'ils ne se forment pas et que le sucre subit la combustion totale.

Dans une culture faite en milieu sucré ordinaire, sans nitrate, l'hydrogène prend naissance dans la transformation du sucre en alcool propylique et en acide propionique; on sait qu'il se forme en outre de l'anhydride carbonique, de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide lactique. Ces alcools et ces acides sont liés à la vie anaérobie de la même manière que l'hydrogène, et si on constate qu'ils se forment en présence d'acide nitrique, on aura le droit de conclure que les nitrates ne changent en rien la nature des fermentations que produisent les microbes en question.

Il s'agit donc de déterminer d'un côté les produits gazeux de la fermentation du sucre, de l'autre les substances retenues par le liquide et de comparer ceux qui sont formés en présence et en l'absence de nitrates.

Les cultures ont été faites en bouillon Martin additionné de 4 p. 100 de saccharose et de 4 p. 1000 de nitrate de potassium. Le volume employé pour chaque culture était de 1250 c.c. Les récipients utilisés étaient des ballons de 3 litres où l'on faisait le vide à la pompe à mercure; les bouchons et les joints en caoutchouc étaient protégés par des manchons remplis de mercure.

L'analyse des produits gazeux de la fermentation a fourni les résultats suivants :

TABLEAU I.

	B. LACTIS AEROGENES		BACILLE DE FRIEDLANDER	
	Avec nitrate.	Sans nitrate.	Avec nitrate.	Sans nitrate.
	cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.
Volume gazeux.	628,4	1.715,15	548,9	1.118,9
CO <sup>2</sup> p. 100 . . .	57,6	64,7	69,3	62,9
H p. 100 . . . .	0,0	33,4	0,0	35 »
NO p. 100. . . .	6,7	0,0	1,2	0,0
N <sup>2</sup> O p. 100 . . .	2,3	0,0	0,0	0,0
N. . . . .	23,4	Résidu indéterminé.	29,5	Résidu indéterminé.

Ces chiffres sont très probants, comme on le voit. L'hydrogène disparaît entièrement en présence des nitrates et l'on trouve, comme résultat de la décomposition de l'acide nitrique de l'azote gazeux, du protoxyde et du bioxyde d'azote, de l'acide nitreux en solution dans le liquide.

Mais si l'acide nitrique fixe l'hydrogène, ce que l'on peut admettre en anticipant sur les conclusions, sa présence ne suffit pas à supprimer tout dégagement gazeux; on se demande donc pourquoi on n'observe pas de fermentation visible en ballons ouverts.

Dans le vide on observe une production de mousse en présence des nitrates; si le même phénomène n'est pas visible au contact de l'air, c'est parce que le gaz carbonique ne se forme pas en quantité suffisante pour saturer le liquide, et parce que l'azote ne représente que le quart environ du volume d'hydrogène dégagé dans les cultures privées de nitrates. L'azote est sensiblement soluble, et, comme la fermentation est ralentie, grâce à la formation d'acide nitreux, ce gaz ne devient lui-même apparent que sous pression réduite.

Dans le liquide on trouve, en présence de nitrate, de l'alcool propylique et de l'acide propionique, de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide lactique. Dans les cultures témoins, on trouve les mêmes substances en plus grande abondance; je ne les ai pas évaluées quantitativement; ce détail importe peu ici, en raison du doute qui persisterait malgré tout sur leur origine, car les matières azotées donnent naissance aussi à des alcools, des acides volatils et fixes, de l'azote en présence d'acide nitreux capable de mettre en liberté l'azote des acides amidés.

Leur détermination qualitative ne présente pas de difficultés; mais je dois dire que l'usage de l'iode, employé dans le but de provoquer la formation d'iodoforme dans le liquide distillé m'a rendu un bon service. Le liquide de culture, distillé en présence d'un léger excès de chaux, laisse passer seulement les alcools avec un peu d'ammoniaque. Le produit de cette opération, soumis à son tour à la distillation fractionnée en présence d'un excès d'acide tartrique, fournit les alcools à l'état de pureté. L'alcool éthylique passe, on le sait, dans la première moitié du liquide; si on traite les prises successives de 10 centimètres cubes par l'iode en présence de soude en introduisant dans un tube d'essais 5 centimètres cubes de liquide, 3 ou 4 gouttes de lessive à 40° B., une paillette d'iode, on obtient une production instantanée d'iodoforme à froid, résultat qui ne s'observe jamais avec l'alcool éthylique



dilué; l'aldéhyde à la concentration de 1/200.000 la donne également; mais ce corps n'existe pas dans le liquide; la réaction ainsi caractérisée persiste; d'ailleurs, jusqu'à la 10<sup>e</sup> prise, en diminuant toutefois d'intensité. Parmi les produits volatils des fermentations microbiennes, l'alcool propylique seul donne cette réaction, lorsqu'on distille 100 centimètres cubes sur 110 par fractions de 10 centimètres cubes. Parmi les acides, la distillation fractionnée permet de déceler l'acide propionique. Ces deux corps ont été mis en évidence par ces procédés dans les cultures additionnées ou non de nitrates, avec cette différence, je le répète, qu'ils sont plus abondants dans le milieu privé de nitrate. L'acide nitreux dont la concentration varie de 1/50.000 à 1/100.000 dans les milieux fermentés joue, en effet, le rôle d'antiseptique vis-à-vis des microbes en question; mais il n'empêche pas leur développement quand on l'introduit préalablement dans les milieux de cultures à la dose de 0,1 p. 1.000. Il joue, d'ailleurs, vis-à-vis des produits gazeux de la fermentation le même rôle que l'acide nitrique; une expérience très simple permet de matérialiser ce résultat: on additionne de la gélose nutritive sucrée de 1 p. 1.000 de nitrate de potassium et de 0,1 p. 1.000 de nitrite de potassium et on enseme dans la masse suivant le procédé de Liborius et de Veillon; les cultures nitritées et nitratées ne produisent pas de dégagement gazeux apparent, les tubes témoins sans nitrates ou nitrites présentent, au bout de douze à seize heures à 30 degrés un émiettement complet de la gélose, qui se trouve même expulsée hors des tubes si l'ensemencement est abondant. Les tubes additionnés de nitrite donnent des cultures bien moins abondantes que ceux qui ont reçu des nitrates; l'action antiseptique de l'acide nitreux est donc évidente; mais son rôle vis-à-vis de l'hydrogène de fermentation est identique à celui de l'acide nitrique; je n'ai pas cherché à établir la nature des produits de fermentation formés en présence des nitrites, mais ils pourraient être facilement mis en évidence, car, lorsqu'on utilise des milieux nitratés, les fermentations se produisent, en réalité, en présence de nitrites.

On pourrait également se proposer d'établir le rapport qui existe entre l'acide nitrique décomposé et la quantité d'oxygène cédé par ce corps et ses dérivés pour en déduire le volume d'hydrogène qui a été fixé de ce fait. Mais ces milieux complexes ne se prêtent pas à des déterminations de ce genre; l'oxygène des nitrates a pu aussi bien se fixer sur du carbone pour donner du gaz carbonique; l'azote libéré ne provient pas non plus en totalité des nitrates, puisque la présence simultanée d'acides amidés et d'acide azoteux libre en rend la formation possible par voie purement chimique. La réduction de l'azote oxydé dépasse sûrement le terme Az et va jusqu'à la formation d'ammoniaque. Pour toutes ces raisons, il est inutile de demander autre chose à ces expériences que les faits qui établissent d'abord la conclusion suivante:

« L'addition de nitrates aux cultures de ferments dénitrifi-

fiants ne modifie pas la nature des fermentations que produisent ces microbes à l'abri de l'oxygène. Les proportions seules en sont changées, grâce à l'influence paralysante qu'exerce l'acide nitreux formé sur le développement des microbes.

### III

La réduction des nitrates par les ferments anaérobies est due au dégagement d'hydrogène.

Cette conclusion résulte également des expériences précédentes et elle dérive directement de celle que je viens de formuler à la fin du chapitre II. Les produits solubles de la fermentation n'étaient pas supprimés par la présence des nitrates, l'hydrogène qui se forme en même temps que ces produits, d'après les équations connues de la fermentation propionique, a donc été mis en liberté; et s'il n'apparaît pas parmi les produits gazeux de la fermentation, c'est parce qu'il est retenu par l'acide nitrique. La décomposition de l'acide nitrique est donc produite par l'hydrogène.

### IV

Tous les microbes producteurs d'hydrogène ne sont pas des dénitrifiants.

A côté des ferments propioniques capables de produire de l'hydrogène, il existe un groupe très important de microbes anaérobies qui jouissent de la même propriété; mais elle est liée à la fermentation butyrique des sucres, des celluloses, des alcools, des acides, etc., et les ferments en question sont connus sous le nom générique de ferments butyriques, bien que l'acide butyrique ou l'alcool butyrique ne soient pas toujours les produits dominants de la décomposition des sucres et des alcools; tous produisent de l'hydrogène et du gaz carbonique; si un dégagement d'hydrogène est suffisant pour effectuer la réduction de l'acide nitrique, les ferments butyriques s'imposent donc *a priori* comme ferments dénitrifiants. Or, il n'en est pas



ainsi. MM. Gayon et Dupetit (1) ont montré, en effet, dans leur remarquable travail sur la dénitrification, que le *b. amylobacter*, le plus actif des ferments butyriques des sucres et des matières amylacées, ne réduit pas l'acide nitrique, bien qu'il produise un abondant dégagement d'hydrogène. Ils ont constaté, d'autre part, que le vibrion septique, qui se range aussi parmi les ferments butyriques par ses propriétés physiologiques, réduit l'acide nitrique ; voici donc deux ferments anaérobies qui produisent de l'hydrogène et qui se comportent de façons différentes vis-à-vis de l'acide nitrique.

J'ai répété ces expériences en utilisant le procédé de culture que j'ai déjà décrit p. 293, tout en les étendant à d'autres espèces de ferments butyriques isolés du milieu que j'ai utilisé dans l'étude de la fermentation forménique [C. R., 1903].

Les ferments butyriques qui produisent de l'hydrogène dans le bouillon Martin additionné de 4 p. 100 de saccharose et de 2 p. 1000 de nitrate de potassium sont :

Le bacillus amylobacter qui, d'après MM. Guyon et Dupetit, produit un volume d'hydrogène légèrement supérieur à la moitié du volume du gaz dégagé.

Le pseudo-tétanique à spore terminale ovoïde, pour lequel le rapport de l'hydrogène à l'acide carbonique est :

$$\text{En présence de nitrate : } \frac{\text{H}^2}{\text{CO}^2} = 1,48.$$

$$\text{En l'absence de nitrate : } \frac{\text{H}^2}{\text{CO}^2} = 1,81.$$

Le bacille en baguette de tambour étudié par M. Oméliansky sous le nom de ferment hydrogénique, qui produit des volumes d'hydrogène et d'acide carbonique dans les rapports suivants :

$$\text{Avec nitrate : } \frac{\text{H}^2}{\text{CO}^2} = 0,80.$$

$$\text{Sans nitrate : } \frac{\text{H}^2}{\text{CO}^2} = 0,97,$$

Le vibrion septique décompose au contraire les nitrates en produisant de l'acide nitreux et en dégageant du bioxyde

(1) *Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniment petits*. Berger-Levrault et C<sup>ie</sup>. Nancy, 1886.

d'azote, du protoxyde d'azote et de l'azote libre exactement comme le *b. bactis aerogenes* ; tout l'hydrogène est fixé par l'oxygène de l'acide nitrique.

On voit donc que tous les producteurs d'hydrogène, ne sont pas, comme on l'a déjà dit, des dénitrifiants ; on constate aussi que le processus de décomposition de l'acide nitrique ne caractérise pas un groupe physiologique de microbes, puisqu'on observe les mêmes modes de fermentation chez des ferments propioniques aérobies facultatifs et des ferments butyriques anaérobies stricts.

## V

La réduction des nitrates par les ferments anaérobies producteurs d'hydrogène peut se faire sans formation de termes de passage apparents entre l'acide nitrique et l'ammoniaque.

La dénitrification par les bactéries peut passer inaperçue chaque fois que les produits intermédiaires entre l'acide nitrique et l'ammoniaque font défaut. Les champignons et les végétaux supérieurs sont des dénitrifiants très actifs, mais ne sont pas considérés comme tels parce que la réduction est totale et que, dans les conditions normales, aucun terme de passage ne permet d'émettre aucune hypothèse sur l'existence d'une transformation graduelle de l'acide nitrique en ammoniaque.

On peut affirmer que des bactéries nombreuses procèdent de la même manière ; mais on conçoit que le fait soit difficile à mettre en évidence dans toute sa généralité. Chez les microbes aérobies, une telle réaction passe inaperçue parce qu'une transformation de nitrates en ammoniaque, limitée aux besoins des microbes en azote, ne peut entraîner qu'une destruction insignifiante de nitrates. C'est donc aux ferments producteurs d'hydrogène qu'il faut s'adresser de préférence pour vérifier l'existence de ce processus, parce qu'une faible quantité d'azote nitrique exige un volume sensible d'hydrogène pour passer à l'état d'ammoniaque.

J'ai obtenu ce résultat avec un mélange de deux ferments butyriques, le bacille du tétanos et un microbe indéterminé qui



se confond morphologiquement avec le premier, la spore exceptée.

Cultivés dans du bouillon Martin additionné de 5 p. 1000 de nitrate de potassium, en présence de 4 p. 100 de saccharose, ils laissent le milieu alcalin et ne décomposent pas l'acide nitrique; l'hydrogène se dégage dans le bouillon nitraté exactement comme dans le bouillon privé de nitrate.

La réduction ne se fait qu'en présence de glucose, parce que les deux microbes ne sécrètent pas de sucrase. La nature des gaz et les volumes dégagés par des cultures faites dans 200 centimètres cubes de bouillon additionné de 4 p. 100 de dextrose et de 5 p. 1000 de nitrate de potassium à 38 degrés, sont fournis par le tableau suivant :

TABLEAU II.

	AVEC NITRATE	SANS NITRATE
Volume des gaz à 0 degré sous 760. . .	307,6	437,8
CO <sup>2</sup> p. 100 . . . . .	100 »	49,87
Hydrogène . . . . .	0 »	50,83

Le nitrate a été entièrement décomposé sans formation de produits intermédiaires; l'azote ne peut donc se trouver qu'à l'état d'ammoniaque ou de dérivés de l'ammoniaque; mais il ne faut pas songer à en faire le départ dans un milieu aussi riche en matières azotées que le bouillon Martin.

La détermination des autres éléments intéressants de la culture a fourni les résultats suivants (1) :

TABLEAU III.

	AVEC NITRATE	SANS NITRATE
Acidité totale en acide lactique par litre. . . . .	5 grammes.	5 grammes.
Acidité volatile en acide butyrique par litre. . .	0,063	0,089
Dextrose détruit par litre . . . . .	43,950	44,299

L'acidité totale est la même dans les deux cultures, ce qui prouve que c'est l'acidification du milieu qui a arrêté la

(1) La toxicité du liquide filtré sur bougie est la même dans les deux cultures. Injecté à des cobayes de 500 grammes environ, il les tue en trois jours, au lieu de vingt-sept à vingt-huit heures, comme les cultures privées de nitrate et de dextrose. Ce résultat est d'accord avec ce que l'on sait de l'influence des acides sur la toxicité des cultures filtrées.

fermentation du dextrose ; on constate qu'elle est plus avancée en présence de nitrate de potassium, parce que l'ammoniaque formée et la potasse libérée ont permis aux microbes de pousser plus loin la destruction du sucre. Ce résultat se traduit d'abord par la disparition d'une plus grande quantité de dextrose et, par voie de conséquence, par la production d'une quantité de gaz carbonique plus grande.

Ce gaz carbonique provient en partie de la dislocation du sucre, peut-être en totalité ; mais il importe de vérifier, autant qu'il est possible s'il ne provient pas à la fois de la combustion du sucre et des matières azotées.

Un gramme de  $\text{NO}^3\text{K}$  exige environ 80 milligrammes d'hydrogène pour se transformer en ammoniaque, potasse et eau suivant la formule :



Or, si on admet que le rapport  $\frac{\text{H}^2}{\text{CO}^2}$  est le même dans les cultures additionnées de nitrate et dans celles qui en sont privées, on peut calculer que la quantité d'hydrogène mise en jeu dans le milieu nitraté est de 27 milligr. 9 ; mais les fermentations ne sont pas identiques dans les deux cas, ce que l'on peut voir d'après l'écart qui existe entre les chiffres de l'acidité volatile ; ces différences ne suffisent pas à combler le déficit de 52 milligrammes accusé par l'analyse entre la quantité d'hydrogène trouvée et celle que la réduction de 1 gramme de nitrate de potassium exige ; d'un autre côté, la rareté des alcools dans le témoin et la culture additionnée de nitrate prouve également que ce n'est pas la formation des alcools qui entraîne un dégagement d'hydrogène aussi important. L'oxygène de l'acide nitrique disparu a donc été absorbé par des réactions qu'il est impossible de démêler, mais qu'il est légitime de ranger parmi les phénomènes de combustion aboutissant plus ou moins directement à un dégagement d'acide carbonique ; en d'autres termes, *l'oxygène du nitrate a été utilisé par les microbes anaérobies de la même manière que par les cellules aérobies.*

Il eût été intéressant de dissocier l'action combinée des deux ferments ; malheureusement cette étude n'a été possible que pour le bacille du tétanos, son associé ayant péri dans les



cultures avant son isolement ; en raison de cette lacune, je n'aurais pas fait état de ces résultats si je n'avais pas déjà eu l'occasion d'enregistrer des faits analogues à propos de la fermentation forménique (*C. R.*, 1903).

Le bacille du tétanos cultivé seul dans les conditions indiquées donne à la fois du gaz carbonique, de l'hydrogène et de l'azote ; mais il a une action peu marquée sur l'acide nitrique qu'il ne décompose pas entièrement, même à la dose de 1 gramme de nitrate de potassium par litre.

J'ai réuni dans le tableau IV les chiffres relatifs aux données les plus intéressantes fournies par quelques cultures effectuées dans 200 centimètres cubes de bouillon Martin glucosé placés dans des fioles de 1 litre, où le vide était fait à la pompe à mercure.

TABLEAU IV.

Richesse du milieu en nitrate de potassium par litre. . . . .	1	1	1
Durée des cultures en jours. . . . .	11	34	38
Volume de gaz dégagés à 760 et à 0 degré. . . . .	33 c.c.	47,88	51,28
	CO <sup>2</sup>	76,09	12,385
Composition centésimale (1). . . . .	H	12,08	7,20
	N	11,83	8,41
Azote nitrique disparu, milligr. . . . .	»	16,41	22,1
Azote dégagé à l'état gazeux, milligr. . . . .	»	5,025	8,1
Azote transformé en AzH <sup>3</sup> ou en ses dérivés . . . .	»	12,35	16

Ces résultats nous montrent que quelques microbes anaérobies réduisent l'acide nitrique tout en n'absorbant qu'une partie de l'hydrogène de fermentation ; on observe alors un dégagement simultané d'azote et d'hydrogène, résultat tout à fait vraisemblable.

(1) Je n'ai pas constaté la présence du formène parmi les produits gazeux : quand on a recours à l'analyse eudiométrique, on constate que le mélange gazeux renferme des traces de CO<sup>2</sup> après le passage de l'étincelle ; mais ce gaz provient des composés sulfurés volatils.

## VI

L'hydrogène de fermentation est l'agent chimique que les anaérobies mettent en œuvre pour assimiler l'azote des nitrates, le soufre des sulfates, et peut-être le phosphore des phosphates; il est possible que le formène joue le même rôle vis-à-vis des phosphates dans la fermentation forménique.

L'hydrogène de fermentation constitue en apparence une anomalie physiologique dont on n'a pas donné jusqu'ici une interprétation satisfaisante; il est cependant tout à fait légitime de le considérer comme un résidu inutilisable de la décomposition plus ou moins médiate de l'eau par des ferments incapables d'emprunter leur oxygène à l'air. A ce titre, il apparaît comme un produit de fermentation qui cadre bien avec la conception que l'on s'est faite de l'origine des substances issues de l'action des ferments. Mais de quelque façon qu'on l'envisage, il reste comme un témoin irrécusable d'un gaspillage énorme d'énergie. Les résultats que je viens d'exposer prouvent qu'il a un rôle actif à jouer dans l'assimilation de l'azote de l'acide nitrique par les anaérobies. Ce qui surprend dans son action, c'est qu'elle n'est pas toujours orientée vers ce but, puisqu'un grand nombre d'espèces microbiennes le mettent en liberté en présence d'acide nitrique comme s'il était indifférent vis-à-vis de ce corps. On est contraint d'invoquer, pour expliquer des faits de cette nature, une organisation anatomique des microbes qui aboutit à une localisation des actions chimiques qu'ils peuvent produire. Quand l'hydrogène se dégage librement dans un milieu de culture nitraté, cela prouve que l'acide nitrique ne le rencontre pas à l'état naissant. L'hydrogène de fermentation n'est donc pas nécessairement lié à la propriété que possèdent les anaérobies d'assimiler l'azote de l'acide nitrique, et dès lors le rôle que je viens de lui assigner manque de généralité.

Mais il n'est pas difficile de combler cette lacune; les microbes sont capables aussi d'emprunter leur soufre aux sulfates, leur phosphore organique aux phosphates; le fait est évident en ce qui concerne le soufre des sulfates. Les ferments butyriques sont des producteurs très actifs d'hydrogène sulfuré, et cet hydrogène sulfuré a comme origine le soufre des sulfates et l'hydrogène de fermentation toutes les fois qu'on produit une fermentation butyrique de l'amidon ou de la cellulose dans un milieu minéral où les sulfates sont abondants.

La fermentation hydrogénique de la cellulose du papier Berzélius, étudiée par Oméliansky, est toujours accompagnée d'une production abondante d'hydrogène sulfuré qui forme, à la surface du mercure de l'éprouvette disposée pour recueillir les gaz, une couche très sensible de sulfure de mercure. Nous nous trouvons donc là encore en présence d'une action de l'hydrogène de fermentation, qui peut être assimilée à celle qu'il exerce vis-à-vis de l'acide nitrique, et qui explique, en partie du moins, pourquoi il se dégage en liberté en présence de nitrate quand les sulfates manquent et *vice versa*, suivant que les ferments peuvent emprunter ou non leur azote à l'acide nitrique ou leur soufre à l'acide sulfurique.

Le dégagement de l'hydrogène s'explique donc par la composition arbitraire de nos milieux de cultures; nous agissons en réalité comme des ignorants vis-à-vis de fonctions physiologiques que nous sommes d'ailleurs bien



incapables d'envisager en connaissance de cause; et quand nous disons que les anaérobies empruntent leur oxygène à l'eau, nous traduisons ce résultat de la façon suivante, sans nous soucier autrement de la valeur de la conclusion : l'oxygène est indispensable aux anaérobies puisqu'il est absorbé; l'hydrogène est certainement inutile puisqu'il est rejeté. Loin d'atténuer la partie de cette conclusion qui présente les faits sous un jour trop étroit, nous cherchons à l'exalter en rompant l'équilibre qui doit exister entre les diverses substances alimentaires du milieu, au profit de celles qui nous semblent les plus intéressantes, tels les sucres par exemple. Une pareille méthode trouve sa justification dans une question d'intérêt particulier qui a souvent prévalu sur les préoccupations d'ordre purement scientifique pour tout ce qui touche aux phénomènes de fermentation.

Les conditions que nous réalisons dans nos milieux de culture n'existent pas dans la nature, et si notre intervention peut les créer accidentellement, le libre jeu des lois naturelles ne tarde pas à remettre les choses dans l'ordre.

Une autre source d'errements réside dans la nécessité où l'on se trouve actuellement d'étudier les propriétés physiologiques d'une espèce considérée isolément. C'est encore une condition qui n'existe pas dans la nature, les exemples bien connus des parasites animaux et végétaux mis à part. Les associations microbiennes, qui se forment spontanément dans le sol, s'organisent, en réalité, de façon à ne rien laisser perdre des sources d'énergie dont elles disposent. Dans les cultures artificielles, les ferments propioniques et butyriques dégagent de l'hydrogène lorsque la composition des milieux de culture s'y prête; il en est de même dans la terre où les substances organiques et minérales ne sont pas non plus réparties de manière à éviter toute déperdition d'hydrogène; mais ici, on voit alors intervenir des espèces qui possèdent la propriété de fixer entièrement l'hydrogène, quel que soit le microbe qui lui donne naissance. J'ai montré que c'est là surtout une des fonctions intéressantes du ferment forménique. Le rôle de cette pseudo-sarcine est de s'emparer de tous les produits des fermentations butyriques, propioniques, acétiques, et de les transformer en acide carbonique, en formène et en eau. L'hydrogène passe donc en totalité ou en partie à l'état de formène. Cette transformation n'est pas réglée non plus dans un but d'économie bien entendue de l'énergie. Mais il est probable qu'on n'observe son dégagement que dans le cas où le formène est en excès sur la quantité que la pseudo-sarcine met en œuvre. Ce que nous venons d'observer en ce qui concerne l'hydrogène de fermentation nous autorise à nous demander si le formène ne peut pas être fixé sur les acides minéraux, et en particulier sur l'acide phosphorique.

Le ferment forménique, par ses propriétés physiologiques et même morphologiques, par sa résistance non pas à l'isolement, mais à la culture pure, par ses rapports avec l'hydrogène de fermentation, constitue un des éléments les plus curieux des nombreuses associations microbiennes qui existent dans la nature. L'étude de ces associations réserve certainement des surprises; l'exemple que je viens de mettre en lumière page 298 est intéressant également; nous allons en aborder d'autres chez les dénitrifiants aérobies.

## VII

Les ferments dénitrifiants les plus actifs sont les mieux adaptés à l'assimilation de l'azote nitrique.

Les phénomènes de dénitrification perdent tout caractère de spécificité puisqu'ils doivent être envisagés comme des transformations qui démontrent que l'acide nitrique est un aliment azoté des microbes. On peut prévoir la possibilité de la formation d'un ou de plusieurs produits intermédiaires entre l'acide nitrique et l'ammoniaque comme on peut s'attendre fréquemment à constater leur absence ; on a même le droit de pousser plus loin ces déductions si l'on fait observer que les termes intermédiaires doivent apparaître ou disparaître dans certaines conditions dont on a souvent la libre disposition, exactement comme on est à peu près en mesure de favoriser ou d'entraver la formation de l'alcool, terme de passage de l'assimilation des sucres.

Je vais fournir de toutes ces assertions une démonstration expérimentale, en m'adressant cette fois à des bactéries aérobies.

Partant de cette conclusion que l'azote nitrique est un aliment des microbes, on est conduit à chercher des ferments de l'acide nitrique dans les milieux naturels où ce composé est la seule substance azotée dont ils puissent disposer.

Les eaux de drainage remplissent ces conditions ; elles sont généralement privées d'azote organique et ammoniacal, presque toujours pourvues de nitrates ; elles doivent donc être peuplées de ferments dénitrifiants. Malgré la facilité avec laquelle on peut se procurer ces eaux, je me suis dispensé d'y recourir parce que de tels milieux peuvent être aisément préparés de toutes pièces. On sait d'ailleurs que ces milieux existent dans la technique bactériologique ; ce sont ceux que Winogradsky a utilisés pour l'isolement et l'étude des ferments nitrifiants. On sait avec quel succès Winogradsky a tiré parti de ces milieux « d'élection » dont la conception a dominé toutes les recherches de Pasteur. Le milieu minéral qui lui



a servi pour l'isolement de ses nitromonades constitue aussi, si mes prévisions sont exactes, un milieu de choix pour la conservation, tout au moins, des ferments dénitrifiants. Tout microbe susceptible de vivre dans ce milieu doit, en effet, assimiler l'acide nitreux ou l'acide nitrique, sans quoi les cultures successives finissent nécessairement par l'éliminer. Or, c'est M. Winogradsky lui-même qui nous apprend qu'il a été trompé dans l'espoir qu'il avait tout d'abord conçu d'arriver à obtenir des cultures pures de nitromonades en éliminant les espèces étrangères par des cultures successives dans un milieu de composition aussi rustique. 4 ou 5 espèces de bactéries ont résisté à ce traitement et ont persisté jusqu'au bout à demeurer les associées des nitromonades, sans apporter cependant de trouble nuisible dans la nitrification, en raison de l'absence de matières organiques.

Tous ceux qui ont eu l'occasion d'isoler de la terre les ferments nitrifiants ont pu vérifier ce fait. Ces bactéries étrangères doivent être, je devrais dire ne peuvent être, que des ferments dénitrifiants.

L'expérience justifie rigoureusement ces déductions. Les bactéries en question, isolées sur les milieux organiques usuels, se sont révélées comme des ferments dénitrifiants, dont quelques-uns sont incomparablement plus puissants que les dénitrifiants propioniques les plus actifs.

J'en ai isolé, à différentes reprises, plusieurs espèces : deux produisent de l'acide nitreux en même temps que des dérivés gazeux de l'acide nitreux dans les milieux organiques additionnés de nitrates ; trois décomposent l'acide nitrique en produisant une fermentation très active, semblable par l'abondance du dégagement gazeux à une fermentation alcoolique ; elles ne forment pas d'acide nitreux, mais fournissent du protoxyde d'azote et de l'azote gazeux dans les milieux ordinaires ; j'ai isolé, enfin, deux espèces qui semblent dépourvues d'action visible sur les nitrates, ce qui ne veut pas dire, nous le savons, qu'elles n'assimilent pas l'acide nitrique ; mais, comme la transformation de l'acide nitrique en ammoniacque rentre dans le cadre des phénomènes généraux bien établis, j'ai délaissé ce côté de la question pour ne m'attacher qu'aux espèces les plus actives dont j'ai retenu 2 sur 3 ; j'ai négligé également celles

qui produisent de l'acide nitreux comme dénuées d'intérêt, du moins au point de vue où je me place.

*On voit ainsi que les ferments dénitrifiants les plus actifs sont les mieux adaptés à l'assimilation de l'acide nitrique ; on a constaté également que les milieux nitrifiants de Winogradsky sont des milieux d'élection pour la séparation des ferments dénitrifiants* en entendant par là, non pas les milieux les plus favorables à leur développement, mais bien les milieux susceptibles de les conserver indéfiniment tout en les débarassant des espèces innombrables du sol qui ne peuvent pas s'y multiplier.

## VIII

Les bacilles dénitrifiants aérobies conservent leurs caractères de microbes aérobies dans les milieux additionnés de nitrates.

Les deux bacilles que j'ai conservés parmi les espèces isolées des milieux minéraux de Winogradsky sont aérobies stricts, très mobiles ; ils forment des voiles sur les bouillons organiques d'origine animale ou végétale additionnés de sucres ; le n° 1 produit sur gélose des cultures très riches et sécrète un mucilage extrêmement abondant ; ses cultures rappellent si bien comme aspect celles du *B. radicicola* que j'ai dû vérifier une fois de plus, sans obtenir d'ailleurs plus de succès qu'autrefois, que ce dernier ne possède pas la propriété de décomposer l'acide nitrique avec production abondante de gaz.

La masse mucilagineuse coule à la surface des tubes placés verticalement et se réunit au fond en formant un dépôt sirupeux de plus d'un centimètre d'épaisseur.

Le n° 2 possède à peu de chose près les mêmes propriétés physiologiques que le n° 1, les cultures en milieu liquide se ressemblent beaucoup ; celles du n° 1 sont plus visqueuses et le voile imparfait est plus épais et plus gras ; sur gélose le n° 2 donne des cultures moins abondantes, sans mucilages ; les colonies sont blanches, opaques, proéminentes, de surface légèrement chagrinée ; des stries se détachent, avec l'âge, des diverticules filiformes dont les sinuosités forment quel-

quefois un lacis assez élégant sur la gélose qui borde les cultures.

Comme ils sont strictement aérobies, je vais tout d'abord examiner l'influence que l'acide nitrique, en raison, comme toujours, de la facilité avec laquelle il cède son oxygène, exerce sur leur développement au contact de l'air ou à l'abri de l'oxygène. J'ai montré que les nitrates ne modifient pas la nature des fermentations que les anaérobies facultatifs ou obligés sont capables de produire; des préoccupations du même ordre que celles qui m'ont suggéré l'utilité d'établir ces points m'obligent encore à démontrer, en guise d'introduction au chapitre des dénitrifiants aérobies, que ces microbes ne peuvent pas se passer d'oxygène libre, même dans les milieux nitrates ou nitrités.

Quand on ensemence des tubes de bouillon de viande ou de haricots sucrés à 2 p. 100 et additionnés de nitrate à 1 p. 100, on constate que la culture se développe fréquemment au voisinage de la surface pour se propager peu à peu dans toute la profondeur du liquide; mais la localisation de la prolifération microbienne dans les régions superficielles est parfois si prononcée que la fermentation y devient déjà apparente pendant que le fond est encore limpide; cette particularité est moins nette et fait même complètement défaut si l'on part d'une semence empruntée à une culture sur milieu solide âgée seulement de deux ou trois jours; ces faits, peu importants par eux-mêmes, laissent cependant supposer que des semences âgées ne peuvent se multiplier tout d'abord qu'au contact de l'air malgré la présence de nitrate, tandis que des bacilles jeunes développés sur milieux solides sont en mesure de décomposer les nitrates.

Si ces interprétations sont justes, il est légitime d'en déduire les deux conclusions suivantes :

1° Les bacilles dénitrifiants aérobies décomposent plus rapidement les nitrates dans les cultures liquides en couche mince que dans le même volume de bouillon en couche épaisse.

2° La décomposition des nitrates dans les récipients vidés d'air par la pompe à mercure est pénible ou même impossible.



Pour démontrer la première proposition j'ai réparti 40 centimètres cubes de bouillon de viande à 2 p. 100 de saccharose et 1 p. 100 de nitrate de potassium dans des fioles d'Erlenmeyer de 200 centimètres cubes, et dans des tubes de 22 millimètres de diamètre ; dans les premiers récipients l'épaisseur du liquide atteint 15 millimètres, dans les tubes, 100 millimètres.

La semence empruntée à une culture en bouillon nitraté en pleine fermentation est introduite dans chaque récipient en quantités strictement égales.

Le tableau V donne les temps employés par les bacilles 1 et 2 pour décomposer entièrement le nitrate ; les évaluations sont faites à partir du moment où commencent les fermentations qui partent d'ailleurs en même temps dans les deux sortes de récipients, jusqu'à la disparition de la réaction des nitrates, le réactif employé étant le sulfate de diphénylamine.

TABLEAU V.

	BACILLE n° 1.		BACILLE n° 2.	
	En fiole. Temps en heures.	En tube. Temps en heures.	En fiole. Temps en heures.	En tube. Temps en heures.
Culture I . . .	24	58	34	58
Culture II . . .	24	72	34	58

Comme on le voit, les différences sont très nettes. Elles sont encore plus frappantes lorsqu'on réalise les cultures en fioles vides d'air, le vide étant fait à la pompe à mercure. Je n'ai pas cherché à obtenir un résultat absolu, mais l'absence complète de développement serait certainement observée si on passait d'une semence empruntée à une vieille culture en milieu liquide ; j'ai utilisé au contraire des cultures jeunes sur milieu solide, et je me suis servi de préférence du bacille n° 2 qui d'après les résultats précédents supporte mieux la privation d'oxygène.

TABLEAU VI.

	CULTURE I		CULTURE II
	1 <sup>re</sup> prise.	Reste.	
Durée des cultures . . . . .	6 jours.	13 jours.	33 jours.
Volume de gaz recueilli en c. c. sous 760 et à 0 degrés . . . . .	83,28	67,8	481,3199
	151,98		
CO <sup>2</sup> p. 100. . . . .	21,39	33,19	
NO. . . . .	28,39	19,63	34,06
Azote . . . . .	50,22	47,18	41,68
Nitrate détruit en grammes. . .		1,0726	1,318
Azote dégagé en grammes . . .		0,4385	0,4499
Azote correspondant au nitrate détruit. . . . .		0,4486	0,1826
Azote transformé en AzH <sup>3</sup> ou en dérivés d'AzH <sup>3</sup> . . . . .		0,0101	0,0327

Les cultures ont été réalisées dans du bouillon de haricot additionné de

2 p. 100 de saccharose et de 1 p. 100 de nitrate de potassium. Le volume employé était de 150 centimètres cubes dans des fioles de 1 litre environ.

Les résultats des deux cultures sont consignés dans le tableau VI. Dans l'une d'elles le gaz a été analysé à deux époques différentes :

Le bacille n° 2, privé d'air, ne détruit pas entièrement le nitrate de potassium au bout de trente-trois jours à 30 degrés ; le microbe réensemencé sur gélose ne peut d'ailleurs être rajeuni au bout de ce temps.

Ce résultat comparé à celui qui s'observe avec des cultures en couche mince, au contact de l'air, montre bien que la décomposition de l'acide nitrique n'est pas une conséquence de la privation d'oxygène chez les microbes strictement aérobies, mais bien le résultat d'un processus d'assimilation de l'azote nitrique ; ce dernier point reste encore à établir, il est vrai, mais j'y reviendrai plus loin. A part ce résultat, les chiffres de ce tableau, que je donne à titre d'indication, ne présentent aucun intérêt ; les rapports des volumes gazeux peuvent en effet varier à l'infini, de même que les quantités absolues dégagées, puisque nous nous sommes placés dans des conditions indéterminées en raison de l'influence capitale de l'âge et de l'origine de la semence sur le développement de la culture.

Il n'est pas difficile de préciser à quoi tient cette influence de la semence.

L'assimilation des nitrates par les microbes aérobies est un phénomène de digestion ordinaire qui se présente comme une fonction normale d'une cellule en état de vie active, et en cela, cette assimilation se fait exactement comme chez les microbes anaérobies. Chez ces derniers, c'est cependant l'hydrogène qui en est l'agent initial ; la réduction de l'acide nitrique exige donc dans ces conditions une ou plusieurs actions diastasiques préalables.

Il en est de même chez les cellules aérobies ; les diastases (1) qui décomposent l'acide nitrique se forment en vie aérobie, et si on prive d'air les microbes dénitrifiants, on les place dans l'impossibilité de renouveler ces diastases. Nous retrouvons donc ici un phénomène analogue à celui que présente la levure

(1) Le mot diastase est employé ici par analogie seulement. Rien ne prouve, en effet, *a priori*, qu'on se trouve ici en présence de substances qui répondent à la définition classique d'ailleurs conventionnelle.

alcoolique qui peut, on le sait, sécréter sa zymase pendant les quelques heures qui suivent le moment où l'oxygène fait défaut. Les bacilles dénitrifiants 1 et 2 n'agissent pas autrement, et comme on a toute latitude pour user de semences d'âge et par suite de puissance zymogène variable, on peut régler, presque à sa guise, l'allure des cultures anaérobies des bacilles dénitrifiants aérobies, mais la présence des nitrates ne provoque pas chez eux la formation de diastases appropriées à la vie anaérobie.

Il est d'ailleurs facile de montrer, par l'emploi de tubes en U soudés à un ballon-pipette que l'obtention de cultures successives, à l'abri de l'air, des bacilles dénitrifiants, est impossible en présence de nitrate.

On fait le vide dans le système, et on utilise le bouillon du ballon, préalablement ensemencé, comme culture destinée à absorber l'oxygène résiduel. Si ce bouillon n'est pas additionné de nitrate, le développement n'a pas lieu; mais si on y a introduit quelques millièmes de nitrate, on observe une prolifération microbienne très nette accompagnée d'une fermentation qui prend, sous l'influence du vide, l'allure d'une action très énergique. Elle est pourtant limitée, et s'arrête assez vite; quand elle s'est éteinte, on transvase dans une des branches du tube en U quelques centimètres cubes de la culture; elle y reste absolument inerte, résultat facile à prévoir après l'examen des faits mis en lumière par les cultures dans le vide.

On peut aussi remplacer les nitrates par les nitrites pour faire cette démonstration. Les bacilles 1 et 2 se développent en effet en présence de 1 p. 1000 de nitrite de sodium dans les cultures aérobies; ils détruisent assez vite l'acide nitreux pour rendre le dégagement gazeux sensible. L'acide nitreux est donc, en principe, une source d'oxygène pour les microbes dénitrifiants, plus efficace que l'acide nitrique puisqu'il est plus fragile, mais il a l'inconvénient de posséder des propriétés antiseptiques très marquées. Aux conditions défectueuses créées aux dénitrifiants 1 et 2 par la privation d'oxygène libre, s'ajoute l'influence paralysante du nitrite; les deux actions suppriment même toute velléité de développement parce que l'acide nitreux détruit la provision de diastase empruntée à la vie aérobie, et,



comme il n'y a pas d'oxygène disponible pour les renouveler, les microbes restent inertes en présence d'une source d'oxygène combiné extrêmement labile, parce que l'oxygène, combiné seul, ne peut pas faire face aux besoins de la vie aérobie.

*Voici donc un produit de fermentation qui se montre très toxique pour les microbes qui le produisent s'il s'accumule dans les milieux de culture, et qui constitue pour eux un aliment normal.*

J'anticipe sur la démonstration en exprimant une telle conclusion, car je n'ai pas encore établi que l'acide nitreux se forme dans la décomposition de l'acide nitrique par les bacilles 1 et 2, ni que cette décomposition constitue un stade du processus d'assimilation des nitrates.

Dans le tableau V j'ai reconnu implicitement qu'une certaine fraction, faible il est vrai, de l'azote nitrique est transformée en ammoniacque ou en ses dérivés; mais lorsqu'on recherche l'ammoniacque libre ou combinée dans le liquide de culture, on n'en trouve pas de trace. On conçoit, en effet, que de petites quantités d'ammoniacque se perdent à l'état gazeux pendant l'extraction des gaz à la pompe à mercure, car le liquide est très alcalin, riche en bicarbonate de potassium qui retient la plus grande partie du gaz carbonique, que je n'ai pas évalué parce que sa connaissance ne m'est d'aucun secours.

J'ajouterai immédiatement que les cultures aérobies n'en renferment pas non plus lorsqu'elles sont réalisées en bouillon de haricot en présence de 2 p. 100 de sucre et de 1 p. 100 de nitrate de potassium. Cela tient sans doute à la cause que je viens de signaler; mais il est bon cependant de ne pas perdre de vue que dans le bouillon de haricot, peu riche en azote, l'ammoniacque formée peut être assimilée en totalité ou en partie. Les milieux peptonés peuvent, au contraire, en raison de leur richesse en azote organique, favoriser la production d'ammoniacque par une voie différente de celle qui nous intéresse.

Il faudrait donc recourir au procédé ordinaire qui consiste à faire le bilan de l'azote mis en jeu, pour montrer l'enrichissement de la culture en azote organique et ammoniacal, aux dépens de l'azote nitrique.

J'ai utilisé la méthode indirecte qui est tout aussi probante dans les conditions rigoureuses où je l'ai appliquée; mais avant d'en venir à ce point, je vais montrer d'abord comment on peut faire apparaître l'acide nitreux dans les cultures, et établir que ce composé est un terme de passage obligé de l'assimilation de l'azote nitrique.

(*A sucre.*)

# L'OXYHÉMOGLOBINE PEUT-ELLE FONCTIONNER

## COMME PEROXYDASE ?

par J. WOLFF et E. DE STOECKLIN

(Travail du laboratoire de M. A. Fernbach).

### I

Dès les premiers travaux sur les oxydases, avant même que la distinction entre oxydase et peroxydase eût été établie, la question s'était posée de savoir si la fonction qui consiste à activer un peroxyde pouvait concourir et prendre part, dans l'organisme, aux phénomènes d'oxydation biologique.

O. Loew (1) a soutenu que l'activation des peroxydes par une peroxydase ne saurait se produire au sein d'organismes vivants en raison de la toxicité des peroxydes; ceux-ci ne pourraient donc, selon lui, exister dans les tissus sans y occasionner des troubles considérables. Bien que partageant cette opinion, Pfeffer a montré que cette toxicité est moindre qu'on ne l'avait supposé, puisque, ayant introduit de l'eau oxygénée dans les organes végétaux, ceux-ci ont continué à vivre malgré ce traitement.

D'autre part, il ressort des expériences de Chodat et Bach (2) que certains champignons peuvent vivre et se développer normalement au contact d'un milieu contenant une notable quantité de peroxyde d'hydrogène. De plus, ces auteurs ont pu déceler (3) la présence de peroxydes dans certains végétaux.

Quoi qu'il en soit, l'on n'a guère rencontré jusqu'ici, dans l'organisme animal ou végétal, de substances justiciables de la peroxydase; les expériences entreprises avec cet enzyme n'ont porté que sur des phénols et des amines généralement absents des liquides physiologiques, comme aussi des cellules vivantes. On peut par contre extraire normalement de végétaux divers : le bolétol, l'orcine, la tyrosine, l'alcool, l'acide salicylique, etc., qui sont attaqués par diverses oxydases.

(1) O. LOEW, *U. S. Dept. of Agric.*, 68, 1900.

(2) CHODAT et BACH, *Arch. Société Physique*. Genève, 17, 1904.

(3) R. CHODAT, *Abderhalden'sche Biochem. Arbeitsmethoden*, 4, 44.



Depuis peu cependant, S. Kostytschew (1) a réussi à oxyder certains produits de dégradation du glucose en faisant agir simultanément sur ces substances une peroxydase végétale et de l'eau oxygénée.

Ces données sont-elles suffisantes pour conclure, avec Gabriel Bertrand, que la peroxydase n'est pas une diastase physiologique et que, dans l'organisme, le rôle oxydant est dévolu aux oxydases? Si les faits énoncés dans la dernière publication de Kostytschew se confirment, cette opinion deviendra bien hasardeuse. Quant à nous, nous réservons notre opinion en ce qui concerne le rôle possible joué par les peroxydases dans le mécanisme d'oxydation de la matière vivante. Toutefois, nous ne croyons pas inutile de répéter ici, au sujet de la constitution des enzymes oxydants, ce que nous avons déjà indiqué ailleurs (2).

Nous ne considérons pas l'enzyme en lui-même, mais la fonction catalytique dont il est le support. Cette fonction est liée à la fois à un élément déterminé bien que variable, le fer par exemple, et à une fonction chimique d'où dépend la labilité des agents actifs. Il est possible aussi que l'état colloïdal puisse intervenir dans ces phénomènes comme facteur important.

Dans le cas des peroxydases, il semble bien que le fer puisse jouer un rôle actif essentiel dans les actions particulières à ces enzymes ainsi que l'ont montré J. Wolff (3), Spitzer (4) et Gola (5). Néanmoins, on ne saurait affirmer que la présence de ce métal soit indispensable à ces actions puisque E. de Stoecklin (6), Rosenfeld (7) et Bach (8) ont obtenu des peroxydases exemptes de fer.

Ces considérations ne représentent pas de simples vues de l'esprit, elles correspondent aux faits que nous avons observés et résument les conclusions que nous en avons tirées. Il importait de les établir succinctement ici afin d'éclairer le lecteur sur

(1) S. KOSTYTSCHEW, *Hoppe Seyler's Zeitschrift*, juillet 1910.

(2) J. WOLFF et E. DE STOECKLIN, *Ann. Pasteur*, novembre 1909.

(3) J. WOLFF, Thèse de doctorat. Paris, avril 1910. *C. R. de l'Ac. de Sc.*, T. CXLVI, p. 781, 1908.

(4) SPITZER *Pfluger's Archiv*, 57, 615, 1897.

(5) GOLA, *Ann. di Botanica*, V, 441, 1907.

(6) E. DE STOECKLIN, Thèse, Genève, 1907.

(7) ROSENFELD, *Pharmac. Instit. Kaiser. Milit.* Petersburg, 1906.

(8) A. BACH, *Berichte*, 1910.

l'état d'esprit qui nous a guidés au cours de ces recherches et de fixer le point de vue qui en a déterminé la direction.

## II

On sait depuis longtemps que la partie pigmentaire du sang exerce sur l'eau oxygénée un pouvoir catalytique manifeste. La réaction classique du bleuissement de la teinture de gaiac, sous l'influence de traces de sang et d'un peu de térébenthine vieillie, n'est qu'une illustration déjà ancienne des propriétés activantes des globules rouges. On sait aujourd'hui que l'essence de térébenthine n'intervient dans cette réaction que parce qu'elle est le véhicule de petites quantités de peroxyde d'hydrogène qui se forment spontanément au sein du liquide, par contact prolongé de l'essence avec l'oxygène atmosphérique.

On a montré que la fonction activante du sang est liée à l'hémoglobine et à l'oxyhémoglobine. Celle-ci est le produit cristallin qui se dépose des solutions salines du contenu des globules rouges.

L'oxyhémoglobine fraîchement préparée est très soluble dans l'eau : elle contient une part d'oxygène libérable qu'elle est susceptible de céder sous l'action du vide ; on peut de la sorte la faire passer à l'état d'hémoglobine. En vieillissant elle devient de moins en moins soluble et fixe définitivement l'oxygène libérable ; elle subit de la sorte une transformation notoire bien que la forme cristalline primitive n'ait pas changé. Il y a eu pseudomorphose. Le produit ainsi formé porte le nom de méthémoglobine.

Nous avons expérimenté la substance active du sang sous ses trois formes (1), et nous n'avons relevé entre elles aucune différence appréciable en ce qui concerne leur pouvoir peroxydasique. Nous en avons conclu que la propriété activante du produit cristallin est liée, non pas à la molécule cristalline dans son ensemble, mais, ce qui était conforme à nos prévisions, à un groupement moléculaire stable commun aux trois

1) Hémoglobine, oxyhémoglobine, méthémoglobine.

formes citées, demeurant inaltéré au cours de ces transformations.

Du point de vue qui nous intéresse, il importe peu de savoir auquel de ces produits nous avons affaire. Nous désignerons désormais pour plus de simplicité par le terme d'oxyhémoglobine la substance active employée au cours de ces essais et qui est le produit de cristallisation du contenu des globules sanguins débarrassé des stromas.

Il importe pour ce qui va suivre de rappeler sommairement quelques-unes des données essentielles que la chimie nous fournit sur la composition de l'oxyhémoglobine. C'est un composé ferroglobulinaire contenant du soufre et 0,308 p. 100 de fer, d'après Vila et Piettre (1). Ce corps est susceptible de se scinder pour donner naissance, d'une part à une globuline incolore et de l'autre à des composés organiques colorés du fer. Au nombre de ces derniers nous citerons : l'hémoporphyrine, l'hématine, que Vila et Piettre ont obtenues à l'état cristallin; puis viennent d'autres dérivés : l'hémine, l'acéthémine de Nencki, extrêmement voisins de l'hématine.

Bien que très fragile dans ses propriétés catalytiques ainsi que nous le verrons plus loin, on estime généralement que l'oxyhémoglobine résiste assez bien aux agents chimiques. Cependant Szreter (2) a montré récemment que ce corps est facilement attaqué par l'eau oxygénée, sous l'influence de laquelle la substance se décolore en donnant un produit lamellaire d'un poids moléculaire supérieur à celui du corps primitif et plus riche que lui en oxygène.

De notre côté, nous avons fait l'expérience suivante :

Dans un tube à essai on met en contact une solution contenant 40 milligrammes d'oxyhémoglobine exempte de catalase avec 2 centimètres cubes  $H_2O_2$  à 2 p. 100 pendant trois minutes. Au bout de ce temps on voit la liqueur, qui tout d'abord s'est colorée en rouge très vif, se décolorer peu à peu et déposer au fond du tube un léger précipité. Si l'on ajoute alors une goutte d'acide chlorhydrique, puis une goutte de ferrocyanure de K, on voit aussitôt se produire la coloration due à la formation du bleu de Prusse. Dans un tube témoin où l'eau oxygénée a été remplacée par de l'eau distillée, on n'observe ni précipité ni coloration par addition de HCl et de

(1) VILA et PIETTRE, *Comptes Rendus*, p. 734 et 1044, 1905.

(2) SZRETER, *Comptes Rendus*, juillet 1910.



ferrocyanure. L'eau oxygénée a donc déplacé le fer dans l'oxyhémoglobine; ce point est important à retenir.

Il est également utile de se souvenir que si l'oxyhémoglobine extraite du globule rouge sans intervention d'aucun agent chimique peut être considérée comme un produit physiologique, il n'en est pas de même des autres corps que nous avons mentionnés et qui tous sont tirés de l'hémoglobine par destruction de la molécule; de sorte que lorsque l'on a affaire à l'un d'eux, on ne sait à quoi il correspond dans la molécule d'hémoglobine, ni même s'il correspond à un groupement chimique existant dans cette substance.

Lorsqu'on fait bouillir une solution d'oxyhémoglobine, la substance se coagule et il reste un liquide clair. L'addition d'une goutte de ferrocyanure au liquide colore en bleu de Prusse certaines parties du coagulum, ce qui montre bien que l'ébullition a détruit la combinaison globulinaire en dégageant le fer sous une forme ionisable.

L'oxyhémoglobine présente cette particularité curieuse d'un corps cristallin donnant avec l'eau une solution colloïdale.

### III

Nous nous sommes demandé, étant donné ce qui précède, si l'oxyhémoglobine ne pourrait pas jouer un rôle catalytique analogue à celui d'un ferrocyanure du fer colloïdal mis en lumière par J. Wolff, c'est-à-dire remplacer les peroxydases dans les réactions typiques de ces enzymes?

La question est très controversée. Elle est grosse de conséquences en raison du rôle physiologique important de l'hémoglobine dans le phénomène de la respiration.

L'action activante que l'oxyhémoglobine exerce sur l'eau oxygénée est indéniable, et les phénomènes d'oxydabilité auxquels l'action simultanée de ces deux substances donne naissance sont nombreux. Nous avons cité le bleuissement de la teinture de gaïac.

R. et O. ADLER ont publié toute une liste de substances oxydables par le système oxyhémoglobine-peroxyde d'hydrogène : amines, phénols, acides aromatiques, etc. Peut-on assi-

miler ces oxydations à celles que provoquent les peroxydases et l'eau oxygénée? Nous ne le pensons pas pour les raisons suivantes : 1° La plupart de ces réactions ne se passent qu'en milieu acide ou alcalin; 2° la plupart des corps oxydés ne le sont pas par les enzymes oxydants; 3° aucun des produits d'oxydation obtenus n'est identique à ceux que l'on obtient par le moyen des peroxydases; 4° on peut arriver à produire les oxydations signalées par ces auteurs en remplaçant l'oxyhémoglobine par la plupart des sels de fer. Or, on ne saurait confondre l'action catalytique des sels de fer vis-à-vis de l'eau oxygénée avec celle des peroxydases; nous l'avons montré ailleurs (1), l'activation provoquée par les sels de fer (2) est d'une soudaineté et d'une violence qui ne sont point le fait des enzymes.

Si l'on se souvient maintenant que l'oxyhémoglobine est un corps très sensible à l'action destructive de l'eau oxygénée et si on considère, comme nous le verrons plus loin, que cette sensibilité s'accroît au contact des acides, des bases et des phénols, on comprendra que, dans ces conditions, la mise en liberté d'un composé de fer plus simple est inévitable. Dès lors, les faits signalés par O. et R. Adler n'ont rien que de normal et les oxydations qu'ils ont observées sont dues, selon toute probabilité, à l'action catalytique du fer séparé de l'hémoglobine.

L'admission de l'oxyhémoglobine, *corps cristallisé*, au rang de peroxydase n'est pas sans présenter, pour notre esprit habitué à une autre conception des diastases, quelque chose de singulier et de choquant. En effet, lorsqu'on a comparé l'action catalytique de la substance pigmentaire à celle des autres peroxydases animales, on a trouvé des différences notables. La comparaison n'est pas heureuse. Ainsi il n'est pas certain, comme le croit Carnot (3), que la peroxydase de la salive soit d'origine animale; Gilbert et Lippmann (4) ont montré que le canal de Stenon est envahi par toute une flore

(1) J. WOLFF et E. DE STOECKLIN, *loc. cit.*

(2) E. DE STOECKLIN et VULQUIN, *Comptes Rendus de l'Acad. des sciences*, CXLII, 1904.

(3) CARNOT, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 375, 1094.

(4) GILBERT et LIPPMANN, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 375, 4904.

anaérobie. Nous avons observé à ce sujet que, chez l'homme, la présence de peroxydase dans la salive est facultative.

Pour ce qui est de la peroxydase de l'urine. Carrière (1) n'en a trouvé que dans les urines pathologiques. Il base son diagnostic sur le dégagement d'oxygène (confondant ainsi la peroxydase et la catalase) et sur la réaction du gaïacol, bien aléatoire lorsqu'on n'obtient pas de tétragaïaquinone. D'autres ont recherché dans l'urine la peroxydase par le moyen de la teinture de gaïac; nous savons trop combien peu on peut se fier à cette réaction.

Reste la peroxydase du pus que Abelous et Biarnès (2) ont réussi à faire passer dans les solutions salines; c'est la seule jusqu'ici qui ait donné des résultats constants. Encore est-on bien certain de n'avoir pas entraîné avec le pus des traces d'oxyhémoglobine? La présence d'autres peroxydases relevées dans les tissus est bien problématique, car il est difficile d'obtenir des macérations d'organes exemptes d'oxyhémoglobine.

Nous ne voulons pas prétendre qu'il n'existe pas de peroxydases animales, mais simplement indiquer combien sont dangereuses et peu sûres les comparaisons que l'on peut être tenté d'établir entre l'oxyhémoglobine et les catalyseurs du même genre extraits de l'organisme animal. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à n'établir de parallèle qu'entre l'oxyhémoglobine et les peroxydases végétales; ces dernières sont du reste bien mieux étudiées que celles du règne animal.

Lorsqu'on parcourt la littérature pour se renseigner sur la nature des phénomènes peroxydasiques dus à l'hémoglobine, on est étonné bien moins de la contradiction des opinions et de la diversité des interprétations qui ont été proposées pour élucider le problème que de l'obscurité qui règne dans le sujet et de l'absence de données permettant d'établir un critérium du phénomène.

C'est ainsi que G. Bertrand (3) pense que le bleuissement du gaïac est dû à une action peroxydasique du pigment:

(1) CARRIÈRE, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 51, 561, 1899.

(2) ABELOUS et BIARNÈS, *Arch. physiol.*, 30, 664, et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 49, 285, 493, 576.

(3) BERTRAND, *Bull. de l'Institut Pasteur*, 398, 1904.



Liebermann (1) attribue l'activité de la substance à la méthémoglobine. Pighini (2) croit à une scission hydrolytique de la molécule avec mise en liberté d'hydroxyde de fer colloïdal actif. Bredig (3), Palladin (4), Kostytschew (5), pour des raisons théoriques, estimant que l'oxyhémoglobine est un réservoir d'oxygène, lui refusent la fonction peroxydasique. Moitessier (6) ne croit pas non plus à l'action peroxydasique de ce corps ; il base son opinion sur le fait que l'ébullition ne fait pas disparaître les propriétés catalytiques de l'oxyhémoglobine vis-à-vis des réactifs de Adler et de la teinture de gaïac. Nous avons fait justice du premier argument ; pour ce qui est du bleuissement du gaïac, nous savons qu'il est aussi bien provoqué par les sels de fer que par les peroxydases. Gessard (7) a du reste montré que cette réaction s'étend à presque tous les extraits d'organes.

Moitessier attribue l'activité de l'oxyhémoglobine à l'hématine, qui donne la réaction du gaïac, tandis que l'hémoporphyrine ne la donne pas. Nous avons dit combien il est hasardeux de vouloir attribuer à l'hématine un rôle prépondérant dans l'action de l'hémoglobine. Czylharz et O. v. Fürth se rangent à l'opinion de Moitessier. Ces auteurs pensent trouver une confirmation de leurs vues dans les faits suivants : à savoir que l'hémoglobine est incapable de catalyser l'eau oxygénée en présence d'iodure de potassium et que, de plus, dans son action sur la leucobase du vert malachite en présence de peroxyde d'hydrogène, la courbe de la progression est tout à fait différente de celle que l'on obtient par l'emploi de la peroxydase du raifort.

Nous avons déjà indiqué ailleurs (8) qu'il n'en est rien et que l'oxyhémoglobine se comporte vis-à-vis de l'iodure de potassium comme une peroxydase très active, et nous allons le montrer. Nous ferons voir également que la leucobase du vert

(1) LIEBERMANN, *Pflüger's Arch.*, 104, 108, 119, 489, 498.

(2) PIGHINI, *Arch. Physiol.*, 4, 57.

(3) PALLADIN, *Hoppe Seyler's Zeitsch.*, 221, 1908.

(4) BREDIG, *Anorganisch. Ferment.*, 87, 1901.

(5) KOSTYTSCHEW, *Hoppe Seyler's Zeitsch.*, juillet 1900.

(6) MOITESSIER, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 56, II, 373, 1904.

(7) GESSARD, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 55, 637, 1903.

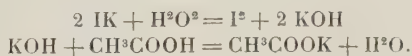
(8) J. WOLFF et E. DE STOECKLIN, *Comptes Rendus de l'Acad. des Sciences*, août 1910.

malachite n'est pas justiciable de l'oxyhémoglobine, mais bien de l'hématine. Du reste, les auteurs se sont servis d'*hématine*, et non pas d'oxyhémoglobine, pour faire leurs mesures.

#### IV

Si l'on n'a pas réussi jusqu'ici à mettre en évidence d'une façon nette les propriétés peroxydasiques de l'oxyhémoglobine, c'est que, d'une part, l'on n'avait pas de critérium assez sûr pour se guider et que, d'autre part, on n'a pas tenu compte de l'extrême fragilité de la fonction peroxydasique du corps en question. Nous espérons, au cours de ce travail, établir l'un et montrer l'autre.

Lorsque Czynharz et v. Fürth ont tenté de réaliser la catalyse de l'eau oxygénée en présence d'iodure de potassium par l'entremise de l'oxyhémoglobine, ils se sont servis de la méthode de Chodat et Bach, qui consiste à doser l'iode déplacé de l'iodure en ajoutant de l'acide acétique très dilué, afin de neutraliser l'alcali mis en liberté à mesure qu'il se forme. On peut représenter les différentes phases de la réaction par les équations suivantes :



L'iode libre se dose alors par une solution titrée d'hyposulfite de soude.

Opérant dans ces conditions, ces auteurs n'ont constaté aucune activation du phénomène; ils ont conclu de ce fait à l'inactivité de l'oxyhémoglobine dans cette réaction.

Nous allons montrer qu'il n'en est rien; mais auparavant, nous indiquerons le mode opératoire auquel nous nous sommes arrêtés dans nos expériences, nous réservant de faire connaître en cours de route les raisons qui nous ont fait modifier la méthode préconisée par Chodat et Bach pour ces mesures.

Nous nous sommes servis de fioles coniques d'une contenance de 60 à 80 centimètres cubes, dont une seule suffit pour les mesures de chaque essai. On introduit dans cette fiole 5 centimètres cubes d'une solution  $\frac{\text{N}}{20}$ .

de IK, 10 centimètres cubes d'acide acétique ou de citrate disodique (suivant les cas), au titre de  $\frac{N}{20}$ , quelques gouttes d'une solution d'amidon servant d'indicateur, puis des quantités variables de catalyseur et, immédiatement après, 2 centimètres cubes d'eau oxygénée (Perhydrol Merck) à 1 ou 2 p. 100 suivant les cas. Au fur et à mesure de son apparition, on dose l'iode dégagé par une solution centime d'hyposulfite de soude, en ayant soin de noter bien exactement aux temps indiqués les quantités d'hyposulfite employées. Ces quantités consignées dans les colonnes de nos tableaux mesurent l'action catalytique. Les essais avec catalyseur ont été contrôlés par des essais témoins sans catalyseur et nous avons soustrait des chiffres fournis par les premiers ceux que nous ont donnés les seconds.

Étant donné les variations que subit la catalyse de l'iode sous l'influence de la température et des moindres changements dans la concentration de la solution de  $H^2O^2$  si peu stable, les différents tableaux ne sont pas toujours rigoureusement comparables entre eux. Seuls, les essais d'un même tableau, faits en une même série, sont parfaitement comparables.

Reprenant les expériences de Czynharz et v. Fürth, nous n'avons pas tardé à nous apercevoir que si l'oxyhémoglobine paraît inerte, ce n'est pas par défaut de sa propriété peroxydase, mais par son impuissance d'agir en présence d'acide acétique; ce corps paralyse la fonction catalytique de l'oxyhémoglobine, et cela proportionnellement à la concentration de l'acide. C'est ce qui ressort du tableau I. Nous avons vérifié que l'action inhibitrice de l'acide acétique s'étend aux acides en général, qu'elle est donc un effet de l'acidité libre et non pas de telle substance particulière.

Chaque essai contient 5 c. c. IK, 2 c. c.  $H^2O^2$ , 5 milligr. oxy. hémogl. (sauf les témoins). On complète tous les essais à 17 centimètres cubes. On laisse le catalyseur 5 minutes en contact avec l'acide avant de mettre la réaction en marche.

TABLEAU I.

TEMPS	Acide acétique.	TÉMOINS		Acide acétique.	1/2 c. c.	1 c. c.	2 c. c.	5 c. c.
		2 c. c.	2 c. c.					
0 m. 30 s.		0,20	0,20		1,50	0,40	0,30	0,20
1 m. »		0,40	0,40		2,40	0,75	0,60	0,40
1 m. 30 s.		0,60	0,60		2,90	1,20	0,90	0,60
2 m. »		0,80	0,80		3,10	1,60	1,20	0,80
2 m. 30 s.	1 »	1 »	1 »		3,20	2 »	1,50	1 »
3 m. »		1,20	1,30		arrêt.	2,40	1,80	1,20
4 m. »		1,60	1,70		—	3,20	2,40	1 »
5 m. »		1,90	—		—	3,90	3,00	1,30

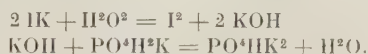
Exceptionnellement, ces chiffres n'ont subi aucune correction.



Ce tableau montre bien que, en présence de 5 centimètres cubes d'acide acétique, dose habituellement employée pour les essais de cette nature, l'action catalytique de l'oxyhémoglobine est nulle.

En réduisant à 2 centimètres cubes la dose d'acide on observe une action très faible qui va croissant à mesure que la quantité d'acide diminue. En se plaçant ici dans les meilleures conditions, on ne peut obtenir, même d'une façon approchée, les effets que l'on observe avec les peroxydases végétales.

A la suite de ces observations, nous avons pensé que l'on parviendrait peut-être à mettre en évidence les propriétés actives de l'oxyhémoglobine dans toute leur plénitude, en la faisant agir dans un milieu exempt d'acide libre, mais capable néanmoins de saturer la base déplacée dans la réaction. A cet effet, nous avons substitué à l'acide acétique le phosphate acide de potassium et les équations précédentes se sont transformées en celles-ci.



Grâce à cette substitution, l'activation provoquée par l'hémoglobine est comparable, tant par l'intensité de son action que par la progression dans la marche du phénomène, à celle de n'importe quelle peroxydase végétale; c'est ce que montre le tableau II.

TABLEAU II.

TEMPS	I 5 mgr. Oxyh. 5 cent. cubes acide.	II 5 mgr. Oxyh. 5 cent. cubes acide.	III 2 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K	IV 3 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K	V 5 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K
0 m. 30 s.	0,40	0 »	1,25	1,75	2,70
1 m. »	0,30	0,15	2,15	2,90	4,30
1 m. 30 s.	0,60	0,30	2,75	3,75	5,80
2 m. »	0,90	0,45	3,10	4,35	6,60
2 m. 30 s.	1,20	0,55	3,50	4,60	7,50
3 m. »	1,50	0,70	3,65	4,95	8 »
4 m. »	1,70	0,90	3,90	5,20	9 »
5 m. »	2 »	1,10	4 »	6,30	9,80

Le phosphate bibasique que nous avons également expérimenté s'est montré tout à fait empêchant à cause de sa basicité trop forte; il s'en forme cependant de très petites quan-

tités au cours de la réaction avec le phosphate acide, mais elles sont sans influence sur le catalyseur tant qu'il reste un excès de monophosphate. Celui-ci cependant n'est pas inoffensif ; on peut s'en rendre compte facilement en comparant son action à celle du citrate disodique. C'est ce que nous montre le tableau III.

Nous avons cherché, par l'emploi de divers sels, à réaliser les conditions de neutralité nécessaires au bon fonctionnement de l'oxyhémoglobine, et nous nous sommes définitivement arrêtés au CITRATE BIBASIQUE, acide à la phtaléine et alcalin à l'orangé. Une solution  $\frac{N}{20}$  de ce sel constitue le milieu de choix pour de telles expériences. Ce point ressort également du tableau III.

TABLEAU III.

TEMPS	1 5 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K	2 5 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K	3 5 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K	4 3 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes PO <sup>4</sup> H <sup>2</sup> K	5 3 mgr. Oxyh. 10 cent. cubes citrate.
0 m. 30 s.	1,90	1,6	2 »	1,5	2,1
1 m. »	3,20	3 »	3,2	2,8	4,3
1 m. 30 s.	4,30	3,6	4 »	3,6	5,5
2 m. »	5 »	4,15	4,5	4 »	6,2
2 m. 30 s.	5,5	4,40	5 »	4,2	6,8
3 m.	5,9	4,70	5,3	4,5	7,2
4 m.	6,2	5 »	5,8	4,7	7,4
5 m.	6,5	5,20	6 »	4,9	7,7

Dans l'essai I, la réaction a été mise en marche sans contact préalable du catalyseur avec le milieu; dans l'essai II, il y a eu 6 minutes de contact préalable avec le phosphate; et dans l'essai III, 6 minutes de contact avec IK. Les essais IV et V sont sans contact aucun.

Le tableau III nous montre qu'au contact de IK (3) le catalyseur ne subit guère de retard dans son action ; le contact du phosphate monobasique (2) lui est au contraire très préjudiciable ; les nos 4 et 5 témoignent également de l'influence retardatrice du phosphate comparée à celle du citrate bibasique alcalin à l'alizarine et à l'hélianthine. Le citrate seul n'exerce aucune action inhibitrice sur l'oxyhémoglobine. Nous avons fait à ce sujet les mêmes observations que nous avons relevées à propos du phosphate, à savoir que la petite quantité de citrate tribasique qui se forme au cours de la réaction est sans influence sur la marche du phénomène ; nous avons de plus constaté que l'adjonction de petites quantités de citrate mono-

sodique est également sans action. Toutefois, qu'il s'agisse de citrate tribasique ou de citrate monobasique, ces sels employés seuls empêchent la réaction de se produire. Cela n'a du reste rien d'étonnant pour le cas du citrate tribasique, ce sel ayant ses trois atomicités saturées.

Un des facteurs les plus puissants de la destruction de l'oxyhémoglobine est assurément l'iode qui se dégage dans cette réaction ; nous l'avons constaté par les expériences que voici :

Si l'on met en train deux essais contenant 5 centimètres cubes IK, 10 centimètres cubes  $\text{PO}_4\text{H}^+\text{K}$ , 2 centimètres cubes  $\text{H}_2\text{O}^2$  à 2 p. 100 et 3 milligrammes d'oxyhémoglobine, et qu'on abandonne le premier à lui-même pendant cinq minutes avant de doser l'iode, au lieu de le saturer au fur et à mesure qu'il se dégage, comme dans le deuxième essai, on emploie dans le premier cas 4,2 c. c. et dans le second 5 c. c. de solution d'hyposulfite de soude. La même expérience répétée avec 5 milligrammes d'oxyhémoglobine donne respectivement 6,6 c. c. et 9,6 c. c. Ces chiffres montrent bien toute la toxicité de l'iode ; les différences entre les chiffres du premier et du second essai sont en effet d'autant plus considérables que la quantité d'iode mise en liberté a été plus grande. Du reste, lorsqu'on suit de près ces réactions, on observe au bout de deux minutes de contact de l'oxyhémoglobine avec l'iode une précipitation de la matière albuminoïde qui va en augmentant à mesure que le temps de contact se prolonge. Ce fait explique pourquoi nous n'obtenons de progression régulière dans l'effet activant de notre catalyseur que pendant l'espace de deux minutes.

CHODAT et BACH, ainsi que E. DE STOECKLIN, ont déjà montré (1) que l'eau oxygénée exerce une action destructive marquée sur la peroxydase du raifort ; nous avons constaté que cette action nuisible du peroxyde d'hydrogène se manifeste d'une façon bien plus considérable encore sur l'oxyhémoglobine.

TABLEAU IV. — 2 CENTIMÈRES CUBES  $\text{H}_2\text{O}^2$  A 1 P. 100 PAR ESSAI.

TEMPS	Peroxydase du raifort, 3 gouttes.			Oxyhémoglobine, 3 milligrammes.		
	I sans contact.	II 3 m. contact avec $\text{H}_2\text{O}^2$	III 5 m. contact avec $\text{H}_2\text{O}^2$	IV sans contact.	V 3 m. contact avec $\text{H}_2\text{O}^2$	VI 5 m. contact avec $\text{H}_2\text{O}^2$
0 m. 30 s.	1,65	1,30	1,20	1,3	0,50	0,10
1 m. »	2,90	2,60	1,95	2,6	0,90	0,30
1 m. 30 s.	3,50	3,25	2,50	3,9	1,30	0,40
2 m. »	4,10	3,80	3 »	4,7	1,50	0,50
2 m. 30 s.	4,70	4,20	3,35	5,3	1,90	0,60
3 m. »	5,10	4,55	3,70	6 »	2,05	0,65
4 m. »	6 »	5,10	4,20	7,0	2,40	0,80
5 m. »	6,40	5,50	4,55	7,9	2,65	1,15

(1) E. DE STOECKLIN, Thèse, Genève, 1907.



La peroxydase végétale qui nous a servi dans ces essais a été extraite du raifort par précipitation alcoolique et dissoute ensuite dans l'eau à une concentration telle qu'une goutte de sa solution correspondait, comme activité, à 1 milligramme d'oxyhémoglobine. Ainsi qu'on peut le voir en comparant les nos I et IV du tableau, l'oxyhémoglobine se montre non seulement plus active que cette peroxydase, mais elle imprime encore à la réaction une marche plus conforme à la règle indiquée par Chodat et Bach que la peroxydase du raifort elle-même.

C'est donc bien à une action peroxydasique que nous avons affaire.

Ce tableau fait voir en outre l'extrême sensibilité du catalyseur animal vis-à-vis de l'eau oxygénée ; le tableau suivant fait ressortir mieux encore cette action inhibitrice du peroxyde ; de plus, il met en lumière un fait curieux, à savoir que le citrate, sans action par lui-même sur l'oxyhémoglobine, favorise par sa présence l'action inhibitrice du peroxyde.

TABLEAU V. — 2 CENTIMÈTRES CUBES  $H^2O^2$  A 1 P. 100.  
5 MILLIGRAMMES OXYHÉMOGLOBINE.

TEMPS	I	II	III
0 m. 30 s.	1,6	0,75	»
1 m. »	3,2	1,40	0,10
1 m. 30 s.	4,7	1,90	0,15
2 m. »	5,6	2,30	0,20
2 m. 30 s.	6,4	2,60	0,35
3 m. »	7 »	3 »	0,50
4 m. »	8 »	3,60	0,80
5 m. »	9 »	4 »	1,10

L'essai I a été conduit normalement ; dans l'essai II, on a mis en contact l'oxyhémoglobine 5 minutes avec  $H^2O^2$  avant de faire partir la réaction ; l'essai III a été fait comme II sauf qu'on a mis le catalyseur en contact à la fois avec  $H^2O^2$  et avec le citrate.

Nous avons indiqué plus haut les causes qui font que l'hémoglobine perd ses propriétés peroxydasiques au contact de l'eau oxygénée ; nous venons de montrer également que l'action nocive de l'iode est le résultat de son action destructive qui précipite la matière globulaire active ; il nous reste à définir le rôle inhibiteur de l'acide acétique.

A cet effet, nous avons institué les expériences suivantes :

On prépare une série de flacons contenant chacun 5 centimètres cubes d'acide acétique  $\frac{N}{20}$  dans lesquels on ajoute 5 milligrammes d'oxyhémoglobine. On laisse les deux substances en présence pendant des temps très exactement mesurés, au bout desquels on neutralise exactement l'acide introduit par une quantité correspondante de soude, puis on met la réaction en marche comme d'habitude en présence de citrate disodique; voici les résultats obtenus.

TABLEAU VI.

TEMPS	I Essai normal sans acide.	II 10 sec. de contact.	III 5 min. de contact.	IV 20 min. de contact.	V 2 h. 1/2 de contact.	VI 48 h. de contact.	VII 72 h. de contact.	VIII 72 h. de contact av. H <sup>2</sup> O sans ac.
0 m. 30 s.	1,40	1,40	0,60	0,35	0,50	0,35	0,25	1,20
1 m. »	2,85	2,60	1,35	0,90	1 »	0,70	0,45	2,65
1 m. 30 s.	4,20	3,60	2 »	1,45	1,45	1,05	0,60	3,65
2 m. »	5,15	4,45	2,45	1,95	1,95	1,35	0,80	4,65
2 m. 20 s.	6 »	5,25	2,90	2,25	2,25	1,60	0,95	5,35
3 m. »	6,65	6,95	3,20	2,55	2,50	1,75	1,05	5,45
4 m. »	7,85	7,15	3,90	3,15	3,50	2,20	1,25	6,90
5 m. »	8,70	8 »	4,40	3,60	3,40	2,50	1,40	7,65

Si l'on compare ce tableau au premier, la première conclusion qui s'impose est que l'acide acétique est empêchant par le fait de la réaction acide, puisque le fait de neutraliser l'acide rend au catalyseur la presque totalité de son énergie si le temps de contact est court. Si l'on pousse l'observation plus avant, on constate que l'acide acétique exerce en plus sur le catalyseur une action destructive croissante qu'on ne peut remonter en neutralisant la liqueur; il est probable qu'à la longue l'acide acétique dédouble l'oxyhémoglobine. L'eau seule ne produit pas ce dédoublement, ainsi qu'en témoigne la dernière colonne de ce tableau.

Nous savons que l'oxyhémoglobine est un corps très instable; il importait de savoir si elle conserve ses fonctions peroxydiques en vieillissant. Un autre problème de la plus haute importance se posait à notre esprit : ces propriétés peroxydiques de l'hémoglobine lui sont-elles bien particulières ou bien sont-elles le produit d'une impureté accompagnant le dépôt pigmentaire cristallin. Le tableau VII répond aux deux questions:

TABLEAU VII.

TEMPS	I Oxyhémogl. 5 milligr. vieille de 1 jour.	II Oxyhémogl. 5 milligr. vieille de 75 jours.	III Oxyhémogl. 5 milligr. vieille de 5 ans.	IV Oxyhémogl. 5 milligr. 1 <sup>re</sup> cristallisation.	V Oxyhémogl. 5 milligr. 2 <sup>e</sup> cristallisation.
0 m. 30 s.	1,80	1,40	1,15	1,30	1,45
1 m. »	3,60	2,60	2,15	2,70	3 »
1 m. 30 s.	4,80	3,60	2,85	3,70	3,95
2 m. »	5,80	4,50	3,40	4,50	4,90
2 m. 30 s.	6,70	5,20	3,85	5,15	5,55
3 m. »	7,20	5,90	4,15	5,65	6,15
4 m. »	8,40	6,80	4,60	6,30	6,90
5 m. »	9,30	7,60	4,80	6,80	7,85

Il ressort de la première partie de ce tableau que l'oxyhémoglobine conserve son action en vieillissant, bien que le produit frais possède une activité supérieure au produit ancien; ceci est bien conforme à ce que l'on observe chez tous les enzymes en général. La seconde partie du tableau nous montre que le produit le plus pur est aussi le plus actif: il est donc certain que l'action peroxydasique est liée à l'oxyhémoglobine et non pas à une impureté l'accompagnant.

Afin de ne pas surcharger ce mémoire de chiffres et de tableaux, nous allons résumer ici la suite de nos expériences et en donner la substance.

Tout d'abord, nous avons comparé entre elles différentes peroxydases que nous avons fait réagir sur l'iodure de potassium, concurremment avec l'oxyhémoglobine; nous avons observé qu'en choisissant un milieu convenable, les peroxydases du raifort, de l'extrait de malt et de la salive se comportent comme l'oxyhémoglobine; leur action catalytique imprime au phénomène une marche qui s'exprime graphiquement par une courbe tout à fait analogue à celle que l'on obtient avec le composé ferro-globulinaire. Il convient néanmoins d'ajouter que les milieux au phosphate et au citrate, qui sont ceux qui conviennent à l'oxyhémoglobine, ne permettent pas aux autres peroxydases d'agir. Nous avons vu que l'inverse est également vrai. L'oxyhémoglobine agit à doses infinitésimales; son action, comme celle des peroxydases végétales, est proportionnelle à sa masse. Quant à l'eau oxygénée, elle n'est activée qu'à partir d'une concentration donnée; l'influence de



la dose de peroxyde joue d'ailleurs un rôle considérable sur la marche de la réaction; son action n'est pas directement proportionnelle à sa masse; elle ne suit pas dans la réaction la loi de Guldberg et Waage. C'est ainsi que, dans les conditions de nos expériences, c'est-à-dire en opérant avec 23 centimètres cubes de liquide total environ et 3 milligrammes d'oxyhémoglobine, 2 centimètres cubes d'eau oxygénée à 0,1 p. 100 sont insuffisants pour amener le déclenchement du phénomène catalytique. Il faut une quantité de peroxyde cinq fois supérieure, soit 2 centimètres cubes à 0,5 p. 100, pour obtenir un effet appréciable; si, dans ces conditions, on dose l'iode mis en liberté au bout de cinq minutes, on obtient le chiffre de 1,75 centimètre cube mesuré en hyposulfite de soude  $\frac{N}{400}$ . Si

l'on double la dose en employant 2 centimètres cubes  $H_2O_2$  à 1 p. 100, le chiffre d'hyposulfite monte brusquement à 6,10 centimètres cubes. Si l'on augmente encore la concentration du peroxyde, la quantité d'hyposulfite s'élève encore, mais faiblement; la réaction subit ensuite une régression et faiblit.

On voit donc que pour obtenir l'effet catalytique optimum, il faut faire la part de ces divers facteurs.

Quelques essais préparés avec de l'oxyhémoglobine contenant une faible proportion de CATALASE nous ont montré que *ce dernier enzyme ne diminue pas sensiblement l'action PEROXYDASIQUE de l'oxyhémoglobine*. Les deux phénomènes catalytiques provoqués, l'un par la catalase et l'autre par la peroxydase, coexistent, et le partage de leur action se fait normalement.

## V

Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, Czynharz et v. Fürth, n'ayant pas réussi à activer l'action de l'eau oxygénée sur l'iodure de potassium par l'intermédiaire de l'oxyhémoglobine, ont cru pouvoir conclure de ce fait que cette substance NE POSSÈDE PAS les propriétés catalytiques des peroxydases. Afin d'établir plus fortement le bien fondé de leur opinion, ces auteurs ont imaginé de choisir, parmi les phénomènes catalytiques dus à l'oxyhémoglobine réagissant sur l'eau oxygénée,

une réaction facile à mesurer et de mettre en parallèle, dans cette réaction, l'oxyhémoglobine avec la peroxydase du raifort. Ils ont eu recours, à cet effet, à la leucobase du vert malachite en solution acétique qui, mise en contact avec de l'eau oxygénée, se transforme peu à peu en une belle matière colorante verte (vert malachite) sous l'influence, soit de l'oxyhémoglobine, soit d'une peroxydase. On mesure l'intensité de la réaction au spectroscope. Or, Czynharz et v. Fürth (1) ont observé que la réaction provoquée par la peroxydase végétale suit dans sa marche la même courbe que celle que donnent Chodat et Bach pour cet enzyme agissant sur IK, tandis que L'oxyhémoglobine imprime à la réaction une progression différente pouvant se représenter graphiquement par une ligne droite.

Nous avons vu par nos expériences que l'acidité du milieu suffit pour abolir, chez l'oxyhémoglobine, toute action peroxydasique et que si la réaction avec la leucobase se produit en suivant une marche différente, elle est due à une fonction catalytique autre que celle que nous avons mise en évidence avec l'iodure de potassium et que nous avons caractérisée comme peroxydasique; du reste, le verdissement de la leucobase persiste même après que la fonction peroxydasique de l'hémoglobine a été abolie par l'ébullition.

De plus, nous avons observé qu'on retrouve dans l'hématine et dans la plupart des dérivés de l'hématine ce même pouvoir d'oxyder la leucobase du vert malachite en présence de peroxyde. Czynharz et v. Fürth (2) ont fait la même observation, si bien que, dans leurs expériences, ils se sont servis, pour mesurer l'action catalytique du pigment, non pas d'oxyhémoglobine, mais d'hématine et d'acéthémine. En poursuivant les mêmes expériences avec la peroxydase du raifort, nous avons constaté que la réaction du vert malachite demandait, pour se produire, des quantités relativement massives du catalyseur végétal. De

(1) V. Czynharz et V. Fürth. *Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie*, t. X, p. 358, 1907.

(2) Comme nous l'indiquons à plusieurs reprises au cours de notre travail, Czynharz et V. Fürth se sont attachés à démontrer que l'oxyhémoglobine est dénuée des propriétés d'une peroxydase. Nous ne nous expliquons pas comment, dans une note récente (*C. R.*, 16 janv. 1911), parue pendant l'impression du présent travail, MM. G. Bertrand et Rogosinski ont pu attribuer à ces auteurs une opinion exactement contraire.

deux solutions de peroxydase, l'une impure et peu active, l'autre débarrassée de nombreux éléments inutiles, très active, celle qui s'est montrée la plus énergique dans son action sur la leucobase était précisément la première. Or, la première contenait une quantité de fer notable que la seconde avait perdu en partie.

Dans ces conditions, nous sommes fondés à dire que la réaction du vert malachite n'est pas justiciable de la fonction peroxydasique de l'oxyhémoglobine, mais bien du groupement hématique stable contenu dans cette substance, et que, si les peroxydases végétales étendent leur action à cette base, il n'est pas improbable que cette action émane d'un groupement ferrique particulier accompagnant la matière active.

A ce propos, il nous a paru nécessaire d'établir une distinction entre les actions *peroxydantes* et les actions *peroxydasiques*.

Les premières sont des phénomènes d'activation des peroxydes d'ordre général, elles semblent liées à l'ion métallique, leur déclenchement brusque et rapide ne se poursuit que pendant un temps très court; leur action n'est spécifique ni par les substances sur lesquelles elle s'exerce, ni par les produits d'oxydation formés, qui sont généralement multiples et indéfinis.

Les actions PEROXYDASIQUES, au contraire, dans leur activation des peroxydes, ont pour particularité de diriger la réaction dans un sens précis et bien délimité; elles semblent liées à un groupement moléculaire particulier où l'élément métallique introduit dans le complexe active un état de labilité spécial qui détermine sa spécificité. Cette spécificité est manifeste autant par les corps attaqués que par les produits fixes qui en résultent. De plus, les actions peroxydasiques sont caractérisées par un déclenchement relativement lent de la réaction se poursuivant ensuite pendant un temps assez long.

La confusion qui règne dans les idées touchant les phénomènes qui nous occupent provient précisément du fait que jusqu'ici on n'a pas établi nettement la différence qui existe entre les *actions peroxydantes* et les *actions peroxydasiques*.

Mais les propriétés peroxydasiques de l'oxyhémoglobine ne s'arrêtent pas là, leur analogie avec celles des peroxydases végétales va plus loin.

Nous avons mentionné plus haut déjà les expériences de O. et R. Adler, dans lesquelles ces auteurs oxydent toute une série de composés organiques au moyen du système oxyhémoglobine eau oxygénée, et nous avons dit pourquoi nous ne pouvons pas assimiler ces phénomènes à ceux que provoquent les peroxydases. Nous estimons que ces réactions sont du même genre que celles que l'on obtient par l'emploi des sels de fer et du peroxyde d'hydrogène. Nous pensons que ces réactions ne sont pas attribuables à l'oxyhémoglobine proprement dite ou, tout au moins, pas au même groupement actif que celui qui provoque la catalyse de l'eau oxygénée en présence d'iodure de potassium, mais au groupement organométallique stable qui se trouve à la base de l'hématine et de ses dérivés : ce sont des actions *peroxydantes* qui sont ici en jeu et non pas des phénomènes *peroxydasiques*.

Si l'on examine dans les expériences de R. et O. Adler celles qui portent sur les phénols employés comme substrata d'oxydation des peroxydases, on constate que ces auteurs n'obtiennent, comme produit final de la réaction, aucun des précipités caractéristiques de ces enzymes. Nous avons indiqué ailleurs (1) et nous insistons encore sur l'importance du produit final d'oxydation dans la caractérisation des phénomènes oxydasiques.

Nous adressant aux trois phénols les plus couramment employés dans cet ordre de recherches : l'hydroquinone, le pyrogallol et le gaïacol, nous sommes parvenus à les transformer en quinhydrone, purpurogalline et tétragaïaquinone en les soumettant, avec certaines précautions, à l'action de l'oxyhémoglobine et de l'eau oxygénée. Disons de suite que l'oxyhémoglobine bouillie conserve ses propriétés oxydantes, mais ne fournit plus alors, avec ces phénols, les substances cristallines que nous avons mentionnées et qui sont spécifiques des peroxydases. Ici donc, l'action *peroxydante* persiste après la disparition du *phénomène peroxydasique*. SI CES RÉACTIONS SI CARACTÉRISTIQUES N'ONT PAS ÉTÉ MISES EN ÉVIDENCE PLUS TÔT, IL FAUT L'ATTRIBUER A L'EXTRÊME FRAGILITÉ DE LA FONCTION PEROXYDASIQUE DE L'OXYHÉMOGLOBINE. Le groupement labile de cette substance est

(1) J. WOLFF et E. DE STOECKLIN. *Annales de l'Institut Pasteur*, novembre 1909.



très sensible à l'action caustique des phénols, ce qui fait qu'on ne peut obtenir le résultat cherché qu'en se servant de solutions phénoliques très diluées. Or, la réaction n'est possible avec l'hydroquinone qu'à l'aide d'une solution saturée du phénol; aussi est-il nécessaire, pour arriver au but, d'employer des doses relativement massives d'oxyhémoglobine. Dans ces conditions, il se forme au bout de peu de temps de beaux cristaux noir vert de quinhydrone.

Pour le pyrogallol, la solution doit être abaissée bien au-dessous de la concentration usitée en pareil cas pour les recherches peroxydasiques; la liqueur jaunit et se trouble peu à peu sous l'influence du catalyseur et du peroxyde, et il se dépose, au fond du vase où se passe la réaction, un dépôt jaune rouge formé, en partie, de cristaux de purpurogalline qu'on reconnaît par la belle coloration bleue qu'ils donnent en présence d'ammoniaque, en partie d'un précipité de globuline détaché de l'oxyhémoglobine sous l'influence destructive du phénol. Il est utile pour obtenir un résultat net d'ajouter au liquide en expérience 1 à 2 centimètres cubes de citrate disodique ou de phosphate monobasique  $\frac{N}{20}$ , qui facilitent la réaction.

Avec le gâïacol, on suit la même technique en agitant sans arrêt le récipient où se poursuit le phénomène; au bout de peu de temps les cristaux de tetragâïaquinone se déposent. Il est ici nécessaire d'avoir recours au citrate ou au phosphate.

## VI

Arrivés au terme de notre exposé, nous résumons les points acquis dans les conclusions suivantes :

1° L'oxyhémoglobine réagit vis-à-vis de l'iodure de potassium et de l'eau oxygénée à la manière d'une peroxydase végétale, tant au point de vue de l'intensité de son action catalytique qu'à celui de la progression qu'elle imprime à la réaction. En effet, si l'on représente les phénomènes provoqués par l'oxyhémoglobine et la peroxydase du raifort par un graphique, tous deux s'expriment par des courbes analogues.

2° L'acidité libre, même en trace, gêne considérablement

la réaction; elle va parfois jusqu'à l'annihiler complètement. L'effet de l'acide est double; il agit à la fois comme paralysant de la réaction et comme destructeur de l'oxyhémoglobine.

3° Les sels acides tels que le phosphate monobasique exercent également une action inhibitrice appréciable sur l'oxyhémoglobine. Parmi tous les sels essayés, le citrate bibasique est celui qui convient le mieux à l'action du catalyseur. Les sels basiques à dose massive et les bases libres à faibles doses sont absolument empêchants. Le sérum sanguin entrave la réaction.

4° Le produit de la réaction, l'iode, est un puissant agent de destruction de l'oxyhémoglobine; aussi faut-il avoir soin de le saturer, au fur et à mesure qu'il se dégage, par de l'hypo-sulfite de soude, pour obtenir des résultats favorables.

5° L'eau oxygénée exerce également une action nocive CONSIDÉRABLE sur l'oxyhémoglobine, aussi ne faut-il l'employer qu'avec précaution et à une grande dilution.

6° Les fonctions peroxydasiques de l'oxyhémoglobine appartiennent également à la méthémoglobine; elles disparaissent par l'ébullition.

7° Les fonctions *peroxydasiques* de l'oxyhémoglobine sont distinctes des fonctions catalytiques *peroxydantes* qui persistent dans ce corps après qu'il a été soumis, soit à l'ébullition, soit à l'action des acides; ces dernières sont du même ordre que celles que provoquent dans les mêmes conditions l'hématine et ses dérivés.

8° Les propriétés peroxydasiques de l'oxyhémoglobine appartiennent bien à un groupement de la molécule cristalline de la substance pigmentaire du sang et non pas à une impureté. Ces propriétés persistent dans la molécule, même après plusieurs années, bien que subissant avec le temps un certain affaiblissement.

9° L'action peroxydasique de l'oxyhémoglobine se poursuit normalement en présence de très petites quantités de catalase; les deux enzymes semblent se comporter comme si chacun d'eux agissait seul.

10° L'oxyhémoglobine réagit comme la peroxydase du raifort, soit sur l'hydroquinone, soit sur le pyrogallol, soit sur le gaïacol pour former à partir de ces corps des produits cristallins définis.

Ces faits nous permettent d'affirmer qu'il n'existe pas de différences *essentiell*es entre l'oxyhémoglobine et les peroxydases végétales.

## VII

Nous avons montré que l'oxyhémoglobine possède des propriétés peroxydasiques indiscutables; il est possible qu'à titre exceptionnel cette fonction du pigment sanguin trouve effectivement à s'exercer dans l'organisme, mais on ne saurait toutefois accepter cette conjecture qu'à *titre d'hypothèse*.

*Nous considérons l'oxyhémoglobine comme un catalyseur oxydasique d'un caractère particulier, concourant dans une certaine mesure au phénomène de la respiration, et qui doit une partie de son activité à la forme spéciale sous laquelle le fer est engagé dans la molécule.*

En mettant en évidence les propriétés peroxydasiques de l'oxyhémoglobine, nous n'avons pas eu la prétention de faire ressortir le rôle physiologique de cette substance en tant que peroxydase; d'autre part, il résulte pour nous, d'expériences en cours, que les phénomènes de fixation et de cession d'oxygène par l'hémoglobine diffèrent à bien des égards de ceux que nous avons étudiés jusqu'ici avec les oxydases.

D'une façon générale, nous pensons que le rôle dévolu aux enzymes oxydants (laccase, tyrosinase) dans l'organisme est accessoire, ou se borne à des actions purement locales. Le phénomène respiratoire de la cellule nous semble différer sensiblement des actions oxydasiques particulières, telles que nous les connaissons aujourd'hui.

Cet exposé n'est qu'une indication. Des recherches plus approfondies dans ce domaine demandent à être poursuivies; c'est à quoi nous allons nous consacrer.

# SUR LE SORT DES COMPOSANTS DU SUC PANCRÉATIQUE AU COURS DE SON ACTIVATION

par M. NICOLLE et E. POZERSKI.

Dans le but d'élucider diverses questions de biologie générale, nous avons été amenés à expérimenter sur le suc pancréatique. Les déductions théoriques qui découlent des recherches rapportées ici et de celles que nous publierons ultérieurement seront présentées en temps et lieu. Nous désirons montrer simplement, aujourd'hui, ce que deviennent les composants du suc lorsqu'il passe de l'état inactif à l'état actif, mentionnant très brièvement les faits déjà connus et insistant sur les autres en proportion de leur nouveauté.

Le suc inactif contient : une gangue albuminoïde, que nous désignerons sous le nom, volontairement imprécis, de substance fondamentale (1) ; des enzymes *vrais* (nous n'envisagerons que l'amylase et la monobutyrynase), des enzymes *bruts* (nous n'envisagerons que la gélatinase et l'albuminase, sans nous demander, maintenant, si elles diffèrent qualitativement ou quantitativement l'une de l'autre) ; un poison *brut* (très mal connu jusqu'à nos recherches).

Lorsque l'on active le suc, voici ce que l'on remarque *objectivement* : autodigestion (disparition progressive de la substance fondamentale) ; disparition progressive de l'amylase et de la monobutyrynase ; transformation des protéases brutes en enzymes vrais, puis disparition progressive de ceux-ci ; transformation du poison brut en poison vrai (escharifiant), puis disparition progressive de celui-ci. Telle est l'histoire que nous nous proposons d'exposer, avec le moins possible de commentaires.

## AUTODIGESTION DU SUC.

Nos études ont porté sur le *suc pancréatique de chien* (fistule temporaire — injection intraveineuse de secrétine). Comme

(1) Comme nous l'avons fait, avec G. Loiseau, pour la gangue albuminoïde ou substance propre des bacilles diphtériques (*ces Annales*, février 1911). — M. N.



*activateur*, nous avons employé d'ordinaire l'entérokinase, mise gracieusement à notre disposition par M. Carrion. Il suffit de faire macérer celle-ci (titre habituel : 10 p. 100) une demi-heure, à 37 degrés, dans l'eau physiologique, et de filtrer ensuite sur bougie, pour obtenir un liquide de grande efficacité. En partant d'une provision convenable de kinase, on assure la comparabilité des expériences. Lorsque l'on remplace le produit précédent par du suc intestinal de chien (recueilli chez un animal porteur d'une fistule duodénale), passé sur Berkefeld, on observe les mêmes phénomènes fondamentaux.

Le suc pancréatique subit, dès qu'on l'additionne de kinase ( $\overline{aa}$ ), une autodigestion fatale et progressive. L'emploi de l'acide trichloracétique, comme réactif, révèle, en effet, la présence d'un coagulum de moins en moins abondant et finalement nul. A la disparition des albuminoïdes naturels correspond l'apparition de peptones et jamais d'albumoses.

*Technique.* — On fait bouillir, rapidement, les mélanges étudiés avec volume égal d'acide trichloracétique à 10 p. 100. On jette sur filtre taré. On lave à l'eau bouillante. On dessèche le filtre (105 degrés). On pèse le précipité. — Le liquide clair, qui a traversé le filtre, reste parfaitement limpide après refroidissement (absence d'albumoses) ; alcalinisé par la lessive de soude et additionné de sulfate de cuivre, il donne la réaction du biuret (présence de peptones).

Ayant observé qu'à 40 degrés, température habituellement choisie dans les expériences sur le suc pancréatique, l'autodigestion évolue trop lentement pour que l'ensemble des phénomènes s'accomplisse dans une journée : convaincus, d'autre part, que cette autodigestion pourrait avoir lieu à des températures supérieures, nous avons opéré à 50 degrés, puis à 60 degrés.

A 50 degrés, les mélanges étudiés perdent la moitié de leurs albuminoïdes coagulables en deux heures, la totalité en quatre heures. A 60 degrés, la moitié en vingt minutes, la presque totalité en une heure (passé ce temps, l'action s'arrête ; il était donc inutile de s'élever au-dessus de 60 degrés).

#### DISPARITION DE L'AMYLASE ET DE LA MONOBUTYRINASE.

*Technique.* — *Amylase.* On porte, à 50 degrés, 50 centimètres cubes d'empois d'amidon (1 p. 100) ; on ajoute 1 centimètre cube du mélange « suc + kinase »

(qui se trouvait, selon les cas, à 50 ou à 60 degrés) et, après cinq minutes, on fait bouillir et dose le sucre par la liqueur de Fehling. — *Monobutyrynase*. On porte, à 50 degrés, 20 centimètres cubes de monobutyryne (1 p. 100) ; on ajoute 1 centimètre cube du mélange « suc + kinase » (qui se trouvait, selon les cas, à 50 ou à 60 degrés) et, après cinq minutes (ou, encore mieux, dix), on fait bouillir et dose l'acide libre par la soude centinormale. — On fait, bien entendu, des *témoins* (amylase et monobutyrynase) avant l'activation.

A 50 degrés, l'amylase disparaît progressivement ; après une heure, elle a perdu la moitié de son activité ; après deux heures, elle est réduite au septième ; après trois heures, au dixième ; puis elle devient rapidement indécélable. A 60 degrés, réduction de moitié après trente minutes ; affaiblissement considérable après une heure ; puis, disparition totale.

A 50 degrés, la monobutyrynase a perdu la moitié de son activité après une heure ; après deux heures, elle est réduite au quart ; après trois heures, on n'en trouve plus que des traces. A 60 degrés, réduction de moitié après trente minutes ; après une heure, simples traces.

Par conséquent, l'amylase et la monobutyrynase disparaissent, à 50 degrés, avant l'autodigestion complète du suc et, à 60 degrés, au moment où cette autodigestion, presque totale, va définitivement s'arrêter.

#### APPARITION, PUIS DISPARITION DES PROTÉASES « VRAIES ».

Pour apprécier l'évolution des enzymes protéolytiques vrais qui apparaissent puis disparaissent au cours de l'activation du suc (plus encore que pour suivre le fléchissement progressif de l'amylase et de la monobutyrynase), il était indispensable de réaliser des expériences susceptibles de fournir une *réponse très rapide*, des « expériences de cinq minutes à 50 degrés ». Aucune difficulté en ce qui concerne la *gélatinase*, car, à son maximum d'activité, elle attaque presque instantanément la gélatine. Il n'en va pas de même de l'*albuminase*, vis-à-vis de son réactif habituel, le blanc d'œuf coagulé. Durant la lente digestion de celui-ci, le suc kinasé continue à subir des modifications qui rendraient illusoire toute appréciation quantitative, même grossière, du ferment étudié. Il fallait donc chercher ailleurs. Nous avons trouvé un test-objet excellent dans le sérum de cheval, préalablement additionné

de quatre parties d'eau *physiologique* et porté cinq minutes à 400 degrés.

### Gélatinase.

*Technique.* — On fait fondre, à 50 degrés, 2 centimètres cubes de gélatine (solution à 10 p. 100 dans l'eau physiologique); on ajoute 1 centimètre cube du mélange « suc + kinase » (qui se trouvait, selon les cas, à 50 ou à 60 degrés) et, après cinq minutes à 50 degrés, on refroidit sous un courant d'eau.

A 50 degrés, la gélatinase n'est pas encore apparue après trente minutes; après une heure, son activité lui permet de liquéfier complètement le tube de gélatine; après six heures, cette activité n'a point varié, mais elle fléchit ensuite et disparaît peu à peu. A 60 degrés, activité maxima après dix minutes; efficacité encore conservée après une heure et demie; disparition après deux heures.

Par conséquent, à 50 degrés, l'apparition de la gélatinase suit de près le début de l'autodigestion du suc; l'activité maxima est atteinte avant que cette autodigestion ne soit arrivée à moitié; elle se maintient, ensuite, après la disparition des albuminoïdes coagulables. A 60 degrés, l'apparition de la gélatinase suit de plus près le début de l'autodigestion; l'efficacité se maintient au cours de celle-ci et disparaît après qu'elle a atteint son état stationnaire.

### Albuminase.

*Technique.* — On porte, à 50 degrés, 2 centimètres cubes de sérum de cheval (préparé comme il a été indiqué plus haut); on ajoute 1 centimètre cube du mélange « suc + kinase » (qui se trouvait, selon les cas, à 50 ou à 60 degrés) et, après cinq minutes à 50 degrés, on dose les albuminoïdes coagulables par l'acide trichloracétique, d'après la méthode ordinaire. On fait, à l'aide de témoins, la somme des albuminoïdes coagulables contenus, d'une part dans le sérum de cheval, d'autre part dans le mélange étudié (au moment de chaque prise); et l'on compare le chiffre obtenu avec celui que donne le titrage du mélange « suc actif + sérum » ayant séjourné cinq minutes à 50 degrés (en négligeant l'autodigestion du suc pendant ce temps très court, erreur des plus vénielles).

A 50 degrés, l'albuminase n'est pas encore apparue après trente minutes; après une heure, elle est capable de digérer les deux tiers du sérum; après deux heures, elle offre son activité maxima (digestion des trois quarts du sérum); après trois

heures et demie, elle commence à fléchir et disparaît rapidement après six heures. A 60 degrés, après dix minutes, on observe la digestion d'un tiers du sérum ; après vingt minutes, des deux tiers ; après trente minutes, des six septièmes ; puis, fléchissement et disparition presque totale après quarante-cinq minutes.

Par conséquent, à 50 degrés, l'apparition de l'albuminase suit de près le début de l'autodigestion ; l'activité maximale s'observe lorsque celle-ci est arrivée à moitié ; le fléchissement a lieu avant qu'elle soit complète. A 60 degrés, l'apparition de l'albuminase suit de plus près le début de l'autodigestion ; le maximum d'efficacité coïncide avec la fonte des deux tiers des albuminoïdes du suc et la chute définitive précède l'état stationnaire de l'autodigestion. [La gélatinase apparaît plus vite que l'albuminase et lui survit toujours longtemps.]

Le suc actif, incapable de digérer le sérum frais de cheval à 37 degrés, l'attaque énergiquement à 60 degrés (il digère encore très bien la gélatine à 65 degrés). Nous nous contentons de mentionner, aujourd'hui, ce fait intéressant qui établit, entre l'albuminase *vraie* du suc pancréatique et celle du suc de papayer (1), une relation des plus suggestives.

#### APPARITION, PUIS DISPARITION D'UN POISON ESCHARIFIANT « VRAI ».

Pour apprécier l'évolution du poison vrai, qui apparaît puis disparaît au cours de l'activation du suc, il fallait être certain que cette activation ne se continue point *in vivo*, sans quoi on eût commis fatalement les mêmes erreurs qu'en employant l'ovalbumine coagulée pour l'étude de l'albuminase *in vitro*. Avec cette différence, toutefois, qu'on aurait eu, dans certains cas, des *réponses très rapides*, puisque le suc actif, à son maximum de toxicité, détermine, en dix minutes, l'apparition d'une eschare humide. Heureusement, l'expérience prouve que le complexe « suc + kinase », injecté sous la peau immédiatement après le mélange des composants, à la dose de 1 centimètre cube, demeure quasi inoffensif (type D — *infra*). Il ne se produit donc, *in vivo*, qu'une activation des plus limitées : affaire de résorption rapide et d'influence « anti » des humeurs.

(1) DELEZENNE, MOUTON et POZERSKI. — *Thèse* de Pozerski.



Les effets du poison escharifiant, contenu dans le suc actif, n'ont guère été étudiés avant nos recherches; aussi nous pardonnera-t-on d'insister quelque peu sur le sujet.

Nous avons employé, comme animaux d'expérience, les cobayes mâles de 400-500 grammes.

Le suc pancréatique *inactif* se montre inoffensif pour eux sous la peau (2 centimètres cubes et plus), dans les veines (2 centimètres cubes) et même dans le cerveau (1/4 centimètre cube); la *kinase* Carrion également.

Le suc *actif*, inoffensif dans les veines (2 centimètres cubes) et le cerveau (1/4 centimètre cube), détermine, sous la peau, une gamme de lésions en rapport avec son degré d'activité. On peut les ramener à 4 types principaux, entre lesquels existent tous les intermédiaires. Ce sont, par ordre décroissant : l'*eschare humide* (type A), l'*eschare sèche* (type B), la *croûte* (type C) et l'*œdème transitoire* (type D). Lorsque l'on injecte 1 centimètre cube de suc, plus ou moins actif, les altérations tégumentaires correspondantes oscillent, *grosso modo*, entre l'étendue d'une pièce de 0 fr. 50 et l'étendue d'une pièce de 1 franc. Il est indispensable de bien connaître cliniquement ces altérations, tant pour la compréhension de nos recherches actuelles que pour celle de travaux ultérieurs.

TYPE A. — On voit apparaître, au bout d'une dizaine de minutes, un œdème très mou et elliptique, à grand axe longitudinal (2-3 centimètres de hauteur, pour 1 à 1,5 centimètre de largeur). La peau sus-jacente ne tarde point à prendre une coloration verdâtre; puis, elle se dénude, progressivement, sur la majeure partie ou la totalité de son étendue. Dans ce dernier cas, l'*eschare* humide est simplement limitée par un piqueté de nuance vineuse; dans le premier, elle s'entoure d'une mince couronne de taches violacées, de plus en plus confluentes, qui se substituent à la teinte verte antérieure des téguments. La région dénudée, d'aspect brillant ou nacré, peut demeurer presque plane et suinter modérément, ou bien bomber assez fort et offrir une exsudation abondante.

Le lendemain, on trouve les lésions en voie de dessiccation plus ou moins avancée; corrélativement, leur étendue a diminué et ce « rétrécissement » imprime, d'ordinaire, une direction transversalement allongée aux parties atteintes de nécrose. Tantôt, le centre de celles-ci, encore humide, rappelle l'aspect du parchemin mouillé, tandis que le reste acquiert une fermeté de plus en plus marquée et un ton brun de plus en plus foncé, à mesure qu'on s'avance vers la périphérie. Tantôt, on aperçoit une *eschare* homogène, semblable, par sa couleur ou sa consistance, à du varech séché au soleil. Dans les deux cas, l'œdème de la veille est demeuré stationnaire, ou bien a déjà diminué (parfois, notablement).

*Le surlendemain*, c'est constamment une eschare sèche; elle noircit vite, en même temps qu'elle adhère fortement aux parties saines voisines. L'œdème, toujours décroissant à ce moment, aura disparu un ou deux jours après.

L'eschare se soulève vers le dixième jour; elle tombe vers le douzième, laissant à sa place un ulcus bourgeonnant, dont la cicatrisation demande environ une semaine.

TYPE B. — Tout d'abord, on observe le même œdème que dans le type A, un peu moins brusque, il est vrai, en son développement. Bientôt après, les téguments correspondants prennent un ton vert très pâle et la portion atteinte se limite par un cercle vasculaire rouge sombre, continu ou non. Puis, apparaissent peu à peu des maculatures violettes, qui confluent en dessinant des figures très variées. Les couches superficielles de l'épiderme qui recouvre la région malade s'exfolient par le frottement, laissant à leur place une surface modérément humide.

*Le lendemain*, la peau, encore violacée au pourtour de la zone atteinte, commence à brunir vers le centre. L'humidité superficielle persiste, ou bien s'est concrétée en croûtes; l'œdème reste stationnaire, ou commence à rétrocéder.

*Le lendemain*, on trouve une eschare foncée, d'ordinaire allongée transversalement, qui noircira de plus en plus. L'œdème, très diminué, disparaîtra vite.

L'eschare se détache du sixième au dixième jour et l'ulcus, qui lui succède, guérit à la fin du deuxième septénaire.

[On observe, avons-nous dit, tous les termes de transition entre les types A et B. On peut en schématiser la gamme descendante de la façon qui suit. Les taches violacées l'emportent de plus en plus, comme étendue, sur la dénudation tégumentaire; c'est-à-dire que le procès d'escharification sèche l'emporte de plus en plus sur le procès d'escharification humide. Finalement, toute manifestation de ce dernier vient à faire défaut et l'on passe alors d'un type B à évolution plus rapide au type B « normal ».]

TYPE C. — Ici, l'œdème initial n'atteint son maximum qu'au bout d'une heure environ. La peau sus-jacente ne change pas de couleur; l'épiderme demeure sain d'apparence, ou bien s'exfolie un peu par le frottement, en laissant une surface légèrement humide.

*Le lendemain*, la majeure partie de la zone malade est recouverte de croûtes disséminées et, sur le reste, l'exfoliation épidermique (provoquée) et l'humidité corrélative ne font jamais défaut. L'œdème est en voie de disparition rapide.

*Le surlendemain*, les croûtes se sont réunies et étendues; elles recouvrent une surface érodée et saignante. On ne trouve plus guère trace de l'œdème sous-cutané.

Les jours suivants, on voit les croûtes se détacher et se reformer à plusieurs reprises. Leur épaisseur diminue peu à peu et les érosions sous-jacentes saignent de moins en moins. Il faut cependant dix à quinze jours pour que la réparation soit complète.

[On passe, schématiquement, du type B au type C de la façon suivante. Les maculatures cutanées deviennent de plus en plus pâles, jusqu'à dispa-

raître, en fin de compte; corrélativement, l'eschare qui leur succède devient une croûte-eschare, perdant peu à peu son caractère vraiment nécrotique.]

TYPE D. — L'œdème se dessine encore plus lentement que dans le type C. Le lendemain, il commence déjà à diminuer et, le surlendemain, il n'en est plus question. La peau demeure toujours absolument saine.

[Dans les types intermédiaires entre C et D, on observe, sur les téguments sus-jacents à l'œdème, des croûtelles de plus en plus minces, bientôt remplacées par un simple furfur qui manque, à la fin, quand on arrive au type D.]

L'injection sous-cutanée de suc actif ne détermine point de *phénomènes généraux* (tout au plus peut-on observer, dans certains cas, une légère baisse de poids); elle n'en favorise pas moins, *éventuellement*, la naissance d'*infections générales ou locales*. (Inutile de revenir ici sur cette influence favorisante des intoxications, étudiée très complètement par l'un de nous, dans plusieurs travaux antérieurs.)

Comme cause d'*infection générale*, on note presque toujours la pasteurellose; les *infections locales*, habituellement dues, elles aussi, à la pasteurella des cobayes, peuvent se diviser en précoce, rapide et tardive. Nous n'en dirons que quelques mots.

INFECTION PRÉCOCE. — Propre au type A et d'*origine pasteurellique*. Elle s'annonce, dès le lendemain de l'injection, par un développement anormal de l'œdème sous-cutané, dont la consistance demeure très molle. La peau sus-jacente, macérée et couverte de sugillations, laisse s'écouler un liquide roussâtre. A la coupe, le tissu cellulaire montre un exsudat compact de couleur jaune bois. Cette infection entraîne la mort dans un certain nombre de cas et ralentit notablement la guérison dans tous les autres.

INFECTION RAPIDE. — Observée avec les types A et B; encore *due à la pasteurella*. Vers le quatrième jour, on voit l'œdème reparaitre ou s'étendre. A la ponction, sérosité rouge ou même sang pur; à la coupe, exsudat jaune serin, de consistance élastique. La mort n'est pas exceptionnelle; ailleurs, guérison constamment ralentie.

INFECTION TARDIVE. — Dans les types A et B; *due à la pasteurella ou au pseudo-pneumocoque* (agent de la « maladie du nez » des cobayes). Elle se traduit par l'empatement de la base de l'ulcus qui succède à l'eschare. Le fond de cet ulcus (plus ou moins allongé verticalement) prend un ton jaunâtre et, sous l'angle inférieur, on voit apparaître une petite collection purulente. La mort ne survient jamais dans l'infection tardive, mais il y a toujours ralentissement du procès cicatriciel.

A 50 degrés, le poison escharifiant apparaît avant la première heure et acquiert presque d'emblée son maximum d'ac-

lité (type A); il conserve cette activité pendant deux heures et ne tarde pas à disparaître ensuite. A 60 degrés, apparition après vingt minutes; efficacité maxima presque d'emblée; disparition après trente minutes. [A 40 degrés, apparition et disparition plus tardives qu'à 50 degrés: c'est cette température qu'il faut choisir quand on veut voir passer le poison par tous ses stades d'activité, croissante puis décroissante.]

A 50 degrés, l'apparition du poison survient au moment où les deux cinquièmes du suc sont autodigérés et sa disparition alors que les quatre cinquièmes ont été déjà transformés. A 60 degrés, apparition quand la moitié de l'autodigestion est accomplie et disparition quand le suc a perdu les deux tiers de ses albuminoïdes coagulables.

A 50 degrés, l'évolution du poison suit assez rigoureusement celle de l'albuminase; à 60 degrés, le poison apparaît avec l'enzyme, mais disparaît avant lui. Il ne saurait être question de les identifier, puisque l'albuminase n'agit point sur les humeurs (ni les tissus) à la température du corps, celles-ci se « défendant » par des propriétés « anti » très accentuées.



# ÉTUDE DE LA FLORE BACTÉRIENNE DU GROS INTESTIN DU CHEVAL

par JEAN CHOUKÉVITCH

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

(Suite et fin.)

Le *B. bifidus* (Tissier [48]) manifeste également une certaine ressemblance avec les microbes acidophiles. Il y a même eu des tentatives d'identification du *B. bifidus* avec le *B. acidoph.* Moro (Rodella), ou bien avec le *B. acidoph.* N° I (de Mereshowsky). Ces tentatives n'ont pas eu de succès. Il est impossible de nier cependant la possibilité de créer un groupe de microbes sinon identiques, mais du moins appartenant à la même famille, dont le *B. bifidus* ferait également partie.

Après avoirensemencé le contenu du gros intestin du cheval dans le bouillon de Hayemann, j'ai obtenu dans tous les cas des microbes acidophiles correspondant au microbe de Moro ou à celui de Mereshowsky. Ordinairement ce dernier se rencontre en plus grande quantité que le microbe de Moro, de sorte que l'on ne réussit pas toujours à isoler le Moro.

De plus, au moyen du bouillon de Hayemann, j'ai isolé trois microbes acidophiles, non identiques aux précédents.

D'après le caractère de ses cultures, le premier ressemblait beaucoup au microbe de Mereshowsky, ne se distinguant que par cette particularité qu'au fond et à la surface de la gélose glucosée, ses colonies atteignaient de grandes dimensions.

Au microscope, il avait l'aspect de bâtonnets qui prenaient le Gram, aux bords légèrement affilés, d'une largeur de 0,5 à 0,8  $\mu$  et d'une longueur de 4 à 7  $\mu$ ; ces bâtonnets étaient pour la plupart accouplés deux à deux. En étudiant les cultures à la surface de la gélose glucosée, on pouvait remarquer au bout de quelques jours que ce microbe a des formes d'involution qui rappellent beaucoup celles qui sont caractéristiques du *B. bifidus*. Ce microbe n'a été isolé qu'une fois, et je laisse la question ouverte, s'il est possible de l'identifier avec le microbe de Mereshowsky, ou bien s'il est nécessaire de le considérer comme une forme particulière du *B. bifidus*.

Ensuite j'ai isolé dans deux cas un microbe ayant l'apparence d'un coccobacille, d'une largeur de 1  $\mu$  et d'une longueur de 2  $\mu$ ; dans le bouillon il présentait des formes encore plus courtes, qui rappelaient celles de cocci. Ce microbe était immobile et prenait le Gram. D'après le caractère de ses cultures il ne se distinguait en rien du précédent microbe.

Enfin, j'ai isolé en deux cas un coccus acidophile. Il prenait le Gram et

ses dimensions étaient à peu près celles du staphylocoque. Il se développait bien à 37 degrés, moins bien à 22 degrés. Dans la gélose glucosée, il forme des colonies blanches, lenticulaires, assez volumineuses, aux bords unis. A la surface de la gélose ordinaire, il ne se développait pas du tout; à la surface de la gélose glucosée, il se développait en produisant un trouble uniforme; faisait coaguler le lait au bout de quelques jours, ne liquéfiait pas la gélatine et ne se développait pas du tout sur pomme de terre. En présence de la glucose, il produisait une quantité considérable d'acide, et, à cause de cela, ses cultures sur gélose glucosée devenaient troubles au bout de quelques jours. Ce microbe n'était pas pathogène pour les lapins et les cobayes.

Tout en reconnaissant l'importance des microbes acidophiles dans la flore intestinale du cheval, il faut considérer que ces microbes, autant que l'on peut en juger, ne peuvent être nuisibles à l'organisme des animaux dans l'intestin desquels ils vivent. Ensuite, comme ils sont capables de développer une quantité considérable d'acide en présence de certains hydrates de carbone, il est très vraisemblable qu'ils arrêtent le développement d'autres microbes. Il est fort peu probable, cependant que, dans le gros intestin du cheval, cette action puisse s'exercer à un certain degré, par la simple raison qu'on y trouve très peu de microbes acidophiles, et parce que la réaction du contenu du cæcum et du côlon du cheval est d'ordinaire faiblement alcaline ou neutre; il est donc évident que ce n'est pas l'acidité qui arrête le développement des microbes qui se trouvent dans le cæcum et le côlon du cheval (1).

Evidemment, la multiplication des microbes acidophiles dans l'intestin est favorisée surtout par le régime lacté. En effet, la plus grande quantité de microbes acidophiles se rencontrent dans l'intestin des enfants et des animaux alimentés par le lait. Je reviendrai sur cette question.

\*  
\* \*

J'ai isolé, en dehors de ceux que je viens de décrire, toute une série de microbes qui ne liquéfient pas la gélatine et qui ne provoquent la fermentation ni de la cellulose ni de l'hémicellulose. Pas un de ces microbes n'a pu être isolé dans tous les

(1) La réaction du contenu du rectum est souvent acide, mais, même dans ce cas, les microbes acidophiles ne forment pas une masse considérable.

cas sans exception. Sont-ils ajoutés accidentellement à la flore intestinale du cheval, ou bien jouent-ils un rôle quelconque dans l'existence de l'organisme? C'est ce que des recherches ultérieures pourront démontrer.

Voici la description de ces microbes, afin de faciliter l'orientation dans le kaléidoscope interminable des microbes qui passent devant les yeux de ceux qui étudient la flore intestinale.

I. — *Streptobacillus anaerobicus magnus*. J'ai constaté la présence de ce microbe dans la moitié des cas étudiés. On réussit à l'isoler en ensemençant une quantité considérable de contenu intestinal dans la gélose glucosée chauffée à 90 degrés, ou bien en ensemençant préalablement en anaérobie le contenu intestinal dans du bouillon acide (1 p. 100). En ensemençant le contenu intestinal sur de la gélose glucosée refroidie à 43 degrés, je n'ai jamais pu réussir à isoler le *str. an. m.*, car il ne se rencontre dans l'intestin du cheval qu'en quantité relativement très petite, et les autres microbes arrêtent facilement son développement.

*Morphologie.* Dans les jeunes cultures, il a l'aspect d'un bâtonnet droit, épais, aux bords arrondis, d'une longueur de 6 à 10  $\mu$  et d'une largeur de 1 à 1 1/2  $\mu$ ; les bâtonnets sont souvent assemblés en chaînettes de longueur différente. Dans les cultures plus vieilles, on rencontre des filaments. Ce microbe est immobile et prend bien le Gram dans des cultures jeunes, mais peu à peu les plus anciennes perdent cette propriété. Comme je l'ai déjà dit, j'ai réussi quelquefois à isoler le *str. an. m.*, en ensemençant le contenu intestinal sur de la gélose chauffée à 90 degrés. Ceci permet de supposer que l'on rencontre dans l'intestin des formes sporulantes de ce microbe. Cependant, je n'ai pu découvrir la présence de spores dans les cultures sur gélose glucosée et dans du bouillon. J'ai rencontré, quelquefois seulement dans les cultures sur gélatine, une petite quantité de formes sporulantes de ce microbe, et alors les grandes spores arrondies se trouvaient disposées aux extrémités des bâtonnets.

*Cultures.* Se développe à 37 degrés et à la température de la pièce; anaérobie strict.

Au bout de 12 à 20 heures, à 37 degrés, le développement se manifeste sur gélose glucosée; il se forme alors des colonies grisâtres translucides, qui ressemblent à des houppes d'ouate; on y distingue quelquefois un centre plus épais; au microscope, ces colonies ont l'aspect de paquets de fils enchevêtrés dans toutes les directions. Il faut ajouter encore que ces colonies sont si intimement liées à la gélose qu'il n'est pas toujours facile de les détacher. Les microbes ne forment jamais de gaz sur gélose glucosée. A la surface de gélose inclinée (cultures anaérobies), on n'a pas obtenu de développement.

A la température de la pièce, le *str. an. m.* se développe sur gélatine, sans la liquéfier. Se développe très faiblement dans du bouillon ordinaire et dans du bouillon glucosé, en formant au fond un dépôt à peine perceptible. Il se développe aussi très peu dans du bouillon glucosé acide, en éliminant un produit intermédiaire glaireux. Ne modifie pas le lait tournesolé. N'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes. Le *B. strp. ana. m.* n'est

pas stable, et si on ne le réensemence pas, il périt au bout de quelques jours.

Il a été dit plus haut que, pendant l'examen microscopique du contenu intestinal du cheval, j'ai rencontré quelques cas anormaux, où l'on apercevait sur les frottis beaucoup de grands bâtonnets qui prenaient le Gram. Ces bâtonnets montraient une grande ressemblance avec le *b. str. an. m.*; comme dans ces cas il était facile d'isoler ce microbe en cultures pures, il faut en conclure que la quantité anormalement considérable de ces grands bâtonnets dans l'intestin, qui prennent le Gram, est due à la multiplication excessive du *b. str. an. m.*

II. — *B. irregularis*. Comme le précédent, ce microbe se rencontre fréquemment dans le gros intestin du cheval. Je l'ai isolé six fois en cultures pures, parfois en ensemençant le contenu intestinal dans de la gélose glucosée chaude (90°), d'autres fois en ensemençant préalablement le contenu intestinal dans du bouillon acide.

*Morphologie*. Dans les jeunes cultures, il a l'aspect de bâtonnets aux bords arrondis d'une largeur de 0,5  $\mu$ , et d'une longueur de 4 à 7  $\mu$ , réunis deux à deux pour la plupart; ils prennent le Gram et sont faiblement mobiles. Au bout de plusieurs jours, il paraît dans les cultures une quantité de formes d'involution, qui remplacent progressivement les formes normales; les bâtonnets apparaissent tantôt effilés, tantôt renflés en massues; leur protoplasma se désagrège en grains isolés, etc.; on rencontre en même temps beaucoup de filaments, tordus de la manière la plus fantaisiste et même quelquefois roulés en spirale. A 37 degrés, dans 5 à 7 jours, le *B. ir.* forme des spores, dont la quantité est toujours minime. Les spores sont dans la partie médiane, ou à l'extrémité des bâtonnets, provoquant un renflement correspondant. On rencontre quelquefois des bâtonnets qui ont une spore à chaque extrémité. J'ai nommé ce microbe « *irregularis* », pour sa tendance à former les formes d'involution que je viens de citer.

*Cultures*. Se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Anaérobie strict. A 37 degrés, sur la gélose glucosée, le développement est visible au bout de 11 à 24 heures; les colonies qui se forment sont blanches, opaques; leur forme est lenticulaire, les bords sont unis. Il ne présente rien de caractéristique au microscope. Si les colonies ne sont pas gênées dans leur développement, au bout de quelques jours elles peuvent atteindre 3 à 5 millimètres de diamètre. *B. irreg.* ne produit jamais de gaz sur la gélose glucosée. A la surface de la gélose ordinaire, il se développe dans des conditions d'anaérobie, en formant des colonies circulaires grisâtres aux bords unis. Ne liquéfie pas la gélatine. Il produit un trouble uniforme dans le bouillon ordinaire et, dans le bouillon glucosé, et quelques jours après, il se forme dans le fond un dépôt d'aspect visqueux. Ne fait pas coaguler le lait, ne forme pas d'indol et produit de l'acide en présence de la glucose. Il n'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes.

III. — *B. bifurcatus gazogenus*. Ce microbe a été isolé trois fois, et dans les trois cas après un ensemençement préalable du contenu intestinal dans du bouillon acide (1 %).

*Morphologie*. Dans les jeunes cultures, il a l'aspect de gros bâtonnets (1 à 2  $\mu$ ) d'une longueur de 6 à 15  $\mu$ , réunis deux par deux ou en chaînettes de longueurs différentes. Dans les cultures plus anciennes, on rencontre de longs filaments. On voit fréquemment les extrémités des bâtonnets



ou des filaments se ramifier en deux courts prolongements. Ce microbe est immobile, prend le Gram et n'est pas sporulent.

*Cultures.* Se développe bien à 37 degrés, mais pas du tout à 22 degrés. Anaérobie strict.

Dans la gélose glucosée, il se développe des colonies blanchâtres, opaques, de forme arrondie, irrégulière, dont le diamètre peut atteindre 0,5 cent.; elles se recouvrent quelquefois de prolongements minces et assez longs. Au microscope, ces colonies se présentent sous l'aspect de formations de couleur foncée, arrondies irrégulièrement, aux bords déchiquetés, ou bien sous forme d'une agglomération de petites boules réunies entre elles par un épais réseau de minces prolongements; ou bien, enfin, ces colonies présentent un centre compact, entouré d'un réseau de prolongements de longueurs différentes.

Dans la gélose glucosée le développement de ce microbe est déjà perceptible au bout de 12 heures après l'ensemencement et, dans ces cultures, il se forme une grande quantité de gaz qui fragmente la gélose; enfin, la réaction alcaline de la gélose devient acide. Dans le bouillon acide ou dans le bouillon glucosé alcalin, ce microbe se développe très faiblement, en formant un léger sédiment au fond du tube. Il ne liquéfie pas la gélatine, ne modifie pas le lait au tournesol et n'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes.

IV. — *Tetracoccus anaerobicus*. Il a été isolé deux fois après l'ensemencement préalable du contenu intestinal dans le bouillon acide (1 0/0).

*Morphologie.* Coccus assez volumineux, d'un diamètre d'environ 5 µ, qui prend le Gram; les cocci sont souvent réunis par quatre, formant des tétrades; on rencontre rarement des paquets formés de huit éléments.

*Cultures.* Se développe bien à 37 degrés, pas du tout à 22 degrés. Anaérobie strict. A 37 degrés, sur gélose glucosée, on observe le commencement du développement 24 à 48 heures après l'ensemencement; il se forme en même temps beaucoup de gaz qui fragmente la gélose. Il se produit d'abord de petites colonies grisâtres; quand elles sont isolées, elles atteignent les jours suivants 2 à 3 millimètres de diamètre et prennent alors un aspect caractéristique: elles s'entourent de quelques prolongements coniques et cela les fait paraître couvertes d'épines, ce qui se remarque mieux quand on examine la colonie à la loupe. Dans la même culture, on peut voir habituellement des colonies de dimensions différentes et de différents degrés de développement.

Dans le bouillon glucosé alcalin et dans le bouillon acide, ainsi que dans le bouillon ordinaire, le développement est très faible et forme au fond du tube un sédiment à peine perceptible. Il ne liquéfie pas la gélatine, ne modifie pas le lait au tournesol et n'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes. Ce microbe a une existence très courte; sans réensemencement il périt au bout de 10 à 15 jours.

V. — J'ai rencontré plusieurs fois dans l'intestin du cheval des microbes ayant une certaine ressemblance avec le *B. N. III de Rodella* [62]; cette ressemblance ne permettait cependant pas de les identifier. Evidemment, il existe un groupe de microbes anaérobies de la même famille, dont le premier représentant a été isolé par Rodella. Il est plus commode de conserver à ce groupe de microbes anaérobies la dénomination de *b. de Rodella*. Je vais donner plus bas la description de deux microbes anaérobies appartenant à ce groupe.

A. Ce microbe a été isolé dans trois cas, après l'ensemencement du contenu intestinal dans du bouillon acide ou sur de la gélose chauffée à 90 degrés.

*Morphologie* : Bâtonnet mobile, prenant le Gram, d'une largeur de  $0,5\ \mu$  et d'une longueur de 5 à  $7\ \mu$ ; deux ou trois jours après le commencement du développement de ce microbe, il forme des spores rondes, situées aux extrémités des bâtonnets; ces derniers ressemblent alors au *b. tetani*.

*Cultures*. Il se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Anaérobie strict. Sur gélose glucosée à 37 degrés, le développement devient perceptible au bout de 36 à 48 heures après l'ensemencement. Il se forme alors des colonies grisâtres, irrégulièrement arrondies, aux bords inégaux, dont les dimensions ne dépassent pas celles d'une tête d'épingle. Au microscope, elles présentent l'aspect arrondi avec des bords inégaux, couverts de petits prolongements.

Dans le bouillon, ce microbe se développe en produisant un trouble uniforme; dans le bouillon acide (glucosé), il se développe mal, en formant un faible dépôt granulé au fond du tube. Il ne liquéfie pas la gélatine, ne fait pas coaguler le lait, ne forme pas d'indol et ne modifie pas les réactions des milieux glucosés. N'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes.

B. Le deuxième microbe qui se rapporte à ce groupe n'a été isolé qu'une fois. Au microscope, il a présenté l'aspect d'un bâtonnet mince ( $0,3\ \mu$ ), qui prenait le Gram, formait des spores ressemblant aux spores caractéristiques du *b. N. III* de Rodella. Ce microbe se développait en général sur tous les milieux nutritifs très lentement et très mal. Dans la gélose glucosée, ses colonies présentaient l'aspect de houppes de ouate. Il ne se distinguait pas autrement du microbe précédent.

VI. — *B. clostridieformis*. Ce microbe a été isolé pour la première fois par Ankerschmit, de l'intestin du veau. J'ai réussi une fois à isoler un microbe anaérobie qui ressemblait à celui d'Ankerschmidt par ses propriétés principales, en ensemençant le contenu intestinal du cheval dans du bouillon acide. Ils ne diffèrent qu'en ceci que le *b. clostridieformis* est immobile, d'après la description d'Ankerschmit, tandis que le microbe que j'ai isolé est très mobile dans les cultures jeunes (à 37 degrés, après les premières 24 heures); ce n'est que plus tard, sous l'action de l'acide qu'il avait produit, qu'il perdait sa mobilité. Comme je n'ai pas observé d'autres différences, j'en conclus que le microbe que j'avais isolé présente une des variétés du *b. clostridieformis*.

VII. — *Streptobacillus anaerobicus rectus*. *Morphologie*. Bâtonnets immobiles, qui prennent le Gram, aux bords coupés droit, de  $0,8\ \mu$  de largeur et de 5 à  $7\ \mu$  de longueur. Ces bâtonnets sont pour la plupart accouplés deux par deux, ou réunis en chaînettes de longueurs variées. Ce microbe donne des spores allongées, disposées dans la partie médiane ou vers une des extrémités du bâtonnet; mais la forme des bâtonnets n'est pas modifiée et, après la sporulation, ils se désagrègent rapidement.

*Cultures*. Se développe à 37 degrés et aussi à 22 degrés. Anaérobie strict. A 37 degrés, dans la gélose glucosée, le développement est perceptible dans vingt à trente heures après l'ensemencement. Les colonies ont l'aspect de petites boules denses, blanchâtres, à surface inégale; les jours suivants, elles augmentent un peu de volume, et si elles se trouvent isolées elles peuvent atteindre dans quelques jours le volume d'un pois. En même temps, les colonies se couvrent de petits prolongements, ce qui les fait

paraître couvertes de duvet. Au microscope, on peut distinguer dans ces colonies un centre dense, entouré d'une zone de prolongements en forme de fils.

En présence de la glucose, ce microbe ne produit pas de gaz, mais il donne une certaine quantité d'acide. Dans le bouillon alcalin, il se développe bien, produit un trouble uniforme et un dépôt au fond; dans le bouillon acide, il se développe faiblement, forme un dépôt blanchâtre peu considérable et ne trouble pas le bouillon.

Il ne fait pas coaguler le lait, ne produit pas d'indol, ne liquéfie pas la gélatine et n'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes.

J'ai isolé une fois seulement le *strept. an. rect.*, après avoirensemencé le contenu dans du bouillon acide.

VIII. — Après avoirensemencé le contenu intestinal dans du bouillon acide, j'ai pu isoler un microbe identique au *b. oviformis* (Tissier, [63]), par ses propriétés morphologiques et biologiques.

IX. — *B. megalosporus*. A été isolé une fois en ensemencant le contenu intestinal sur de la gélose chauffée à 90 degrés.

*Morphologie*. Bâtonnet assez épais (1  $\mu$ ) et court (3 à 5  $\mu$ ), aux bords arrondis, prenant le Gram; dans les vieilles cultures on en rencontre de plus longs. Quand le développement commence, trois ou quatre jours après, ce microbe forme des spores rondes, volumineuses, disposées à une des extrémités des bâtonnets; relativement aux dimensions des bâtonnets, les spores sont très volumineuses et occupent souvent la plus grande partie de la cellule bactérienne.

Dans les jeunes cultures, ils prennent bien le Gram, mais en vieillissant ils perdent bientôt cette propriété.

*Cultures*. Anaérobic strict. Il se développe à 37 degrés et à la température de la pièce.

Sur gélose glucosée, à 37 degrés, on observe un développement 12 à 20 heures après l'ensemencement. Il se forme alors de fines colonies lenticulaires, aux bords unis. En présence de glucose, ce microbe ne produit pas de gaz, mais de l'acide. Il se développe dans le bouillon, en y provoquant un trouble uniforme, ne fait pas coaguler le lait, ne liquéfie pas la gélatine et ne produit pas d'indol. Le cobaye auquel on avait fait une injection intrapéritonéale de 4 cent. cubes de culture en bouillon de ce microbe a succombé au bout de 3 jours à une péritonite fibro-purulente. Dans l'exsudat de l'abdomen et dans la rate, on a pu constater la présence d'une quantité considérable du *b. megalosporus*. Le lapin auquel on avait fait une inoculation sous-cutanée de la même quantité de culture en bouillon n'a pas manifesté de phénomènes pathologiques.

X. — *B. tetani*. Je n'ai jamais réussi à isoler ce microbe au moyen des tubes de Veillon, du contenu intestinal du cheval frais, ni de ce contenu soumis à la putréfaction, ni des tubes de milieux spéciaux, ensemencés de ce contenu. Pour pouvoir résoudre la question de la présence de ce microbe dans le gros intestin du cheval, j'ai fait à des souris des injections sous-cutanées du contenu intestinal de ce dernier.

Dans cette intention, j'ai injecté à une souris 1/2 cent. cube du contenu intestinal frais; à une autre, la même quantité du contenu intestinal chauffé à 90 degrés; et ensuite, à une troisième, la même quantité du contenu intes-

linal chauffé et putréfié. J'ai ainsi étudié le contenu intestinal de dix-huit chevaux, et la présence du *b. tetani* n'a été constaté que dans deux cas.

Dans le premier cas, en injectant le contenu intestinal frais, et, dans l'autre cas, le même produit putréfié. Il faut ajouter que la plupart des souris injectées par le contenu intestinal frais ont péri de l'injection mixte (du *b. coli* et du streptocoque).

Il en résulte donc que l'on ne réussit pas toujours à mettre en évidence la présence du *b. tetani* dans le gros intestin du cheval, et, même alors que le *b. tetani* se rencontre dans le gros intestin du cheval, il s'y trouve en si petite quantité qu'il est impossible de l'isoler du mélange des autres microbes.

XI. — *B. tenuis non liquefaciens. Morphologie.* Dans les jeunes cultures, il présente l'aspect d'un bâtonnet mince ( $0,3 \mu$ ), d'une longueur de 3 à  $5 \mu$ . Dans les cultures plus anciennes, on rencontre des chainettes, composées de plusieurs individus, et aussi des formes d'involution, ressemblant à des masses, à des clostridies, etc. Ce microbe est capable de produire des spores; les spores ne prennent naissance qu'après un séjour assez prolongé des cultures à l'étuve, et ne sont jamais bien nombreuses. Elles sont petites, d'une forme arrondie ou allongée, situées pour la plupart aux extrémités des bâtonnets, plus rarement dans la partie médiane, en provoquant le renflement correspondant. La forme de ces renflements est variée; tantôt elle rappelle une boule, tantôt elle a un aspect irrégulier avec une extrémité effilée. Le *b. ten. non liqu.* est mobile et prend le Gram.

*Cultures.* Se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Anaérobie facultatif.

A 37 degrés, le lendemain de l'ensemencement, il se produit à la surface de la gélose, des colonies petites, grisâtres, translucides, qui rappellent les colonies des streptocoques. Les jours suivants, les colonies augmentent un peu de diamètre, mais restent toujours plates et minces. Quand on étale la semence à la surface de la gélose, il se forme un voile grisâtre, translucide, très mince. Au microscope, les colonies superficielles, aussi bien que celles qui sont profondes, présentent l'aspect de disques aux bords unis. Ce microbe provoque dans le bouillon un trouble uniforme, puis il se forme à la surface une pellicule grisâtre, fragile. Les cultures de bouillon répandent une odeur qui rappelle celle de l'huile à brûler. Ce microbe ne coagule pas le lait, n'a pas de développement sur pomme de terre, ne produit pas d'indol; en présence de glucose ou de lactose, ne produit ni gaz, ni acide. Ne liquéfie pas la gélatine. N'est pathogène ni pour les cobayes, ni pour les souris.

J'ai isolé ce microbe en examinant le contenu intestinal en putréfaction et chauffé. Dans huit cas, quand j'ai cherché à constater sa présence, je n'ai obtenu de résultats positifs que trois fois.

XII. — *Bacillus tardus. Morphologie.* Dans les jeunes cultures, c'est un bâtonnet droit, mobile, qui prend le Gram, d'une largeur de  $0,5$  à  $0,6 \mu$  et d'une longueur de 3 à  $5 \mu$ ; dans les vieilles cultures, surtout dans les milieux liquides, se forme un grand nombre de filaments. Ce microbe donne des spores relativement volumineuses, situées dans la partie médiane des bâtonnets.

*Cultures.* Se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Aérobie strict. A 37 degrés, à la surface de la gélose, au bout de trente à quarante-huit heures, le développement commence; il se forme à la surface



de la gélose de petites colonies légères, grisâtres, qui paraissent recouvertes de petits plis quand on les examine au microscope.

Quand on l'étale à la surface de la gélose, au bout de deux jours environ se développe un voile léger, à peine perceptible, qui s'épaissit ensuite, devient opaque et prend une teinte grise. Dans le bouillon, ce microbe produit un trouble uniforme; il ne liquéfie pas la gélatine et ne coagule pas le lait. Il ne produit pas d'indol et ne forme ni gaz, ni acides en présence de la glucose et de la lactose. N'est pathogène ni pour les cobayes, ni pour les souris.

J'ai isolé ce microbe trois fois en étudiant le contenu intestinal, chauffé à 80 degrés et putréfié.

XIII. — *Coccobacillus mobilis non liquefaciens*. Ce microbe a été isolé deux fois, en ensemençant sur gélose le contenu intestinal frais.

*Morphologie*. C'est un coccobacille d'une largeur de  $0,8 \mu$  environ et d'une longueur de  $1 \frac{1}{2}$  à  $2 \mu$ , aux bords arrondis, quelquefois effilés; on rencontre rarement des formes plus longues. Il est mobile, prend le Gram et ne forme pas de spores.

*Cultures*. Il se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Anaérobie facultatif.

Le développement est perceptible à 37 degrés, à la surface de la gélose, au bout de deux jours environ; il se forme alors un voile grisâtre, translucide, très mince; ou bien de très fines colonies, translucides, qui rappellent les colonies des streptocoques. Dans la gélose glucosée profonde se forment des colonies blanches, lenticulaires, aux bords unis. Il n'y a jamais de dégagement de gaz dans ces conditions. Dans le bouillon, ce microbe produit un trouble uniforme, ne liquéfie pas la gélatine, ne modifie pas le lait au tournesol, ne produit pas d'indol, ne se développe pas sur pomme de terre.

XIV. — *B. rosescens*. Bâtonnet mobile, prenant le Gram, aux bords arrondis, d'une largeur de  $0,5$  et d'une longueur de  $4$  à  $10 \mu$ ; à mesure que les cultures vieillissent, il apparaît beaucoup de fils de longueur différente. Au bout de sept à dix jours, ce microbe forme des spores à 37 degrés; le nombre des bâtonnets qui présentent des spores est très restreint. Il se forme alors des spores arrondies d'un diamètre de  $0,8$  à  $1,0 \mu$ , situées aux extrémités des bâtonnets et qui causent leur élargissement correspondant.

*Cultures*. Se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Aérobie strict. A 37 degrés, à la surface de la gélose, paraissent le lendemain même des colonies grises, complètement circulaires, aux bords unis et au centre légèrement surélevé, qui atteignent au bout de quelques jours  $0,5$ - $1$  centimètre de diamètre. Par transparence, les colonies semblent composées d'une série de cercles concentriques. Au microscope, les colonies profondes et les colonies superficielles ne présentent rien de caractéristique. Quand on étale la semence à la surface de la gélose, il se forme un voile gris, homogène. Ce microbe produit un pigment rosé qui se diffuse dans la gélose. Cette faible teinte rosée de la gélose se manifeste nettement dans la première semaine du développement du *b. ros.*; ensuite la gélose devient plus foncée et sa teinte rosée n'est plus perceptible. Dans le bouillon, le *b. ros.* se développe très lentement; il se forme en même temps, au fond du tube, une petite quantité de sédiment bianchâtre; puis, au bout de dix à douze jours, il se produit un léger trouble dans le bouillon. *B. ros.* ne

modifie pas le lait au tournesol, ne liquéfie pas la gélatine et produit sur la pomme de terre un voile jaune, peu abondant. Ce microbe ne produit pas d'indol, et en présence de glucose et de lactose ne forme ni gaz, ni acides. Il n'est pathogène ni pour les cobayes, ni pour les souris.

J'ai isolé deux fois le *b. rosescens* en étudiant le contenu intestinal en putréfaction.

XV. — *Coccobacillus plicatus*. *Morphologie*. C'est un coccobacille immobile, qui prend le Gram, et dont la forme et les dimensions rappellent le *b.* du choléra des poules.

*Cultures* : Se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Aérobie strict.

A la surface de la gélose se développe une pellicule assez épaisse et fragile, qui rappelle la culture de la tuberculose des oiseaux. Les colonies isolées peuvent atteindre des dimensions considérables et occupent quelquefois toute la surface du tube. Leur surface est ridée, les bords sont fortement sinueux. Dans le bouillon, ce microbe produit un faible trouble, et à la surface du bouillon se développe une mince pellicule, composée de fines écailles. Sur pomme de terre, le *coc. plic.* forme un voile sec et ridé de nuance jaunâtre. Le *coc. plic.* ne modifie pas le lait au tournesol, ne donne pas d'indol, ne produit ni gaz, ni acide en présence de glucose, et n'est pas pathogène pour les lapins et les cobayes.

Ce microbe a été isolé une fois en ensemençant sur gélose du contenu intestinal frais.

XVI. — En ensemençant sur gélose du contenu intestinal frais, j'ai isolé dans trois cas un coccus qui présente une certaine ressemblance avec le *micrococcus roscidus*, à en juger d'après la description de Matzuschita.

*Morphologie*. C'est un coccus de dimensions très variées. On le rencontre, dans la même préparation, de dimensions plus grandes et de dimensions plus petites que les staphylocoques. Coloré par le Gram, ce microbe se décolore facilement et semble se trouver sur la limite entre les microbes qui prennent cette coloration et ceux qui ne la prennent pas.

*Cultures*. Il se développe à 37 degrés et à la température de la pièce. Anaérobic facultatif. A la surface de la gélose, il forme un voile gris, doux, assez abondant, d'un aspect visqueux. Les colonies isolées sont assez volumineuses et ont l'aspect de gouttes glaireuses. En piqûre sur gélatine, ce microbe se développe, formant une mince tige, de laquelle rayonnent des prolongements courts et minces; la gélatine n'est pas liquéfiée en même temps.

Sur pomme de terre, il forme un mince voile d'un jaune clair. Dans le bouillon, il produit un trouble uniforme, ne coagule pas le lait, ne produit pas d'indol, et en présence de glucose ne forme pas d'acide. N'est pas pathogène pour les lapins et pour les cobayes.

Enfin, j'ai isolé une fois le *microc. caudicans*, et une fois une *sarcine* qui paraissait identique avec la *sarcina vermicularis* de Gruber; une fois la *levure grise* et plusieurs fois l'*actinomyces (streptothrix) albus*. Tous ces microbes ont été isolés en ensemençant du contenu intestinal frais sur de la gélose.

\*  
\* \*

Grâce à la bienveillance de M. Metchnikoff, j'ai eu l'occasion d'étudier la flore intestinale d'un poulain nourri au lait de vache stérilisé. Certaines circonstances, indépendantes de ma volonté, m'ont empêché d'achever mes recherches, mais les quelques données que j'ai obtenues méritent une mention.

Premièrement, nous voyons, à l'examen au microscope du contenu intestinal de ce poulain, que la quantité de bacilles qui prennent le Gram est très grande relativement à celle que nous avons vue chez le cheval adulte; quelquefois la quantité de ces microbes est plus grande que celle des microbes qui ne prennent pas cette coloration.

Secondement, en ensemençant en gélose glucosée refroidie à 43 degrés le contenu intestinal de ce poulain, j'ai réussi à isoler entre autres les microbes suivants : le *b. acidophilus* Moro, le *b. acidophilus* n° I de Mereshowsky, le *b. bifidus*, le *b. clostridieformis*, le *b. ventriosus* (1) (Tissier) [63], et quelques autres anaérobies qui seront décrits plus loin.

Comme nous l'avons vu, il m'a été impossible d'isoler du contenu intestinal du cheval adulte certains de ces microbes; et ceux que j'ai vus chez le cheval adulte (microbes acidophiles, *b. clostridieformis*) n'ont pu être isolés qu'après un ensemencement préalable du contenu intestinal en bouillon acide, c'est-à-dire après élimination des espèces dominantes.

Ainsi, dans la flore intestinale de ce poulain nourri au lait, les espèces de microbes qui dominaient dans la flore du cheval (le *b. coli*, l'entérocoque, le streptocoque), étaient délogées et leur place était prise par les microbes cités plus haut. Evidemment, ce caractère de la flore du poulain tient au régime lacté qui favorise la multiplication des microbes acidophiles et du *b. bifidus*.

Voici la description de quelques microbes isolés de l'intestin

(1) Le microbe que j'avais trouvé coagulait le lait, se distinguant par là du microbe de Tissier. Cette différence n'est cependant pas essentielle et ne permet pas de considérer le microbe que j'ai isolé comme une espèce particulière.

de ce poulain. Autant que je sache, ces espèces n'ont pas encore été décrites.

I. — *Coccobacillus anaerobicus parvus*. Petit coccobacille immobile, d'une largeur de  $0,5\ \mu$ , d'une longueur de  $1\ \text{à}\ 1\ 1/2\ \mu$ ; souvent réunis deux à deux ou en courtes chainettes. Quelques jours après, le protoplasma de ce coccobacille se désagrège en 2 à 5 articles, ce qui lui donne une certaine ressemblance avec le streptocoque. Le *coc. an. parvus* prend bien le Gram.

*Cultures* : Anaérobie strict. Ne se développe pas à 22 degrés. A 37 degrés, sur gélose glucosée, le développement a lieu le troisième ou le quatrième jour. Les colonies sont petites et ont l'aspect de petites boules d'un gris blanc, aux bords unis. Il ne se produit pas de gaz dans ces conditions. Il se développe mal dans le bouillon ordinaire, très abondamment dans le bouillon glucosé, en produisant un trouble violent et un sédiment volumineux au fond du tube. Il coagule le lait, mais très lentement, pas avant 20 à 25 jours après l'ensemencement. Ne liquéfie pas la gélatine. N'est pathogène ni pour les lapins, ni pour les cobayes.

II. — *Le micrococcus gazogenes*. Ce coccus prend le Gram, a un diamètre de  $2\ \mu$  environ; quelquefois réuni deux par deux ou en courtes chainettes.

*Cultures* : Anaérobie strict. Ne se développe pas à 22 degrés. A 37 degrés, sur gélose glucosée, le développement commence au bout de 24 heures. Si l'ensemencement est abondant, il se produit, dans la gélose glucosée, un trouble compact qui atteint la zone d'anaérobie. Si l'ensemencement n'est pas abondant, il se développe des colonies volumineuses, blanches, d'une forme lenticulaire, aux bords unis. Il se produit en même temps beaucoup de gaz qui fait éclater la gélose, et la réaction alcaline de celle-ci se transforme en réaction acide. Il se développe abondamment dans le bouillon glucosé en produisant un trouble uniforme; très faible développement dans le bouillon ordinaire. Il ne coagule pas le lait, ne liquéfie pas la gélatine. Il est peu stable et périt dans 5 à 7 jours si on ne le réensemence pas de nouveau.

J'ai enfin isolé un microbe qui ressemble beaucoup au *b. thetoides*. Le microbe que j'ai isolé se distingue de celui-ci par sa propriété de ne pas former de filaments.

#### CONCLUSIONS

On rencontre une grande quantité d'espèces microbiennes dans le gros intestin du cheval.

Les unes, auxquelles se rapportent le *b. coli*, l'entérocoque, le streptocoque, les microbes acidophiles de Mereshowsky et Moro, le *B. Welchii*, le *B. putrificus*, le *B. sporogenes* A, le *b. gazogenes*, les agents de la fermentation de la cellulose, le *b. hastiformis*, le *b. flavescens liqu.*, ont pu être isolées dans tous les cas sans exception, employant la technique propre à les mettre en évidence.



Tous les autres microbes n'ont pu être isolés que dans un certain nombre de cas. Selon l'habitude établie, on aurait dû les rapporter à ce que l'on appelle « la flore accidentelle », tandis que les premiers constituent évidemment la flore constante. Cependant, cette conclusion admet une certaine réserve, car nos méthodes d'isolement sont encore tellement imparfaites, et la détermination complète de tous les microbes contenus dans l'intestin demande un travail si considérable, qu'il faut y regarder à deux fois avant de tirer des conclusions de faits négatifs. Je crois donc que bien des microbes que je n'ai pu isoler dans tous les cas appartiennent néanmoins à la flore constante. Cette remarque s'applique surtout au *b. amylobacter* et au *b. mesentericus*.

Comme nous l'avons déjà vu, dans le gros intestin du cheval, le *b. coli*, l'entérocoque et le streptocoque, autant qu'il s'agit de cas normaux, sont bien supérieurs en quantité à tous les autres microbes, lesquels se trouvent ainsi relégués au second plan.

Bien entendu, les propriétés chimiques du contenu intestinal étant le milieu dans lequel se développent les microbes intestinaux, doivent jouer un rôle prépondérant dans la détermination des différents caractères de la flore. Ces propriétés chimiques du contenu intestinal sont déterminées, d'une part, par les propriétés des aliments, et, d'autre part, par le caractère de la digestion. La composition de la flore intestinale des chevaux est donc déterminée par les propriétés de leurs aliments, c'est-à-dire par l'alimentation végétale (foin, avoine) et par le mode de la digestion qui leur est propre.

Il est permis de demander s'il n'existe pas d'autres facteurs et si cette composition, dans laquelle les espèces dominantes sont le *b. coli*, le streptocoque et l'entérocoque, peut être expliquée par le fait que les propriétés chimiques du contenu du gros intestin du cheval n'admettent le développement abondant que de ces trois microbes, au détriment des autres microbes qui y sont contenus.

Dans des tubes stérilisés, j'ai introduit environ 30 cc. de contenu intestinal et, ayant pratiqué le vide dans ces tubes, je les portais à l'étuve. J'examinais tous les jours au microscope le contenu de ces tubes. J'ai pu me convaincre de l'appa-

rition de nouvelles espèces bactériennes, les bâtonnets de formes et de dimensions variées, prenant le Gram. Cette production de nouvelles formes était assez lente pendant les 2 à 3 premiers jours, et n'atteignait son maximum qu'au bout de 3 à 5 jours. Il en résulte que les propriétés du contenu intestinal n'excluent donc pas le développement abondant d'un grand nombre de microbes qui y sont contenus; car si, dans les conditions normales, dans le gros intestin du cheval ces microbes ne se développent pas au degré qu'ils atteignent dans le liquide intestinal putréfié, c'est parce que le développement de ces microbes est relativement lent et que les masses fécales sont entraînées au dehors avant que les microbes aient eu le temps de se multiplier pour atteindre les limites indiquées. Nous devons donc admettre un certain rapport entre la composition de la flore intestinale du cheval et le temps pendant lequel les masses fécales séjournent dans l'intestin, c'est-à-dire entre la composition de la flore intestinale et la structure et la fonction de l'intestin.

Ce n'est pas tout. Si nous prenons un tube avec du liquide intestinal, et si nous le chauffons à 80 degrés avant de le porter à l'étuve, afin d'éloigner les microbes asporulés, nous verrons que, dans le liquide chauffé, la production de nouvelles espèces bactériennes est plus rapide que dans les tubes de contrôle qui contiennent le liquide non chauffé. Parfois, au bout de 24 heures déjà, on peut apercevoir dans les préparations faites avec le liquide chauffé une grande quantité de bâtonnets, de formes et de dimensions variées, et qui prennent le Gram, tandis que dans le liquide intestinal non chauffé, et dans le même temps, on n'aperçoit pas de nouvelles espèces, ou seulement une très faible quantité.

Au bout de deux à cinq jours, la différence entre les tubes s'efface, car, dans le liquide intestinal chauffé, les bâtonnets commencent à former des spores et à se désagréger, tandis que, dans le liquide non chauffé, la production de nouvelles espèces bactériennes avance toujours lentement. Il faut noter encore que les caractères morphologiques des espèces bactériennes dans le liquide intestinal chauffé et dans le liquide non chauffé sont loin d'être identiques. Dès le début, afin d'établir une égalité parfaite dans les conditions de l'expé-

rience, j'introduisais le liquide intestinal dans un seul tube; je le secouais avec précaution, et je le partageais ensuite en deux parties égales, dont l'une seulement était chauffée.

Il s'est rencontré des cas où il était impossible de reconnaître une différence dans le développement d'une nouvelle flore bactérienne entre tubes chauffés et non chauffés. Ces irrégularités s'expliquent par la constitution chimique différente du liquide intestinal, et par les quantités variables de microbes sporulés qui s'y trouvent.

Mais, en somme, les cas où des différences ont été constatées nous permettent de conclure qu'il existe beaucoup de microbes dans l'intestin du cheval, qui pourraient se développer plus rapidement et plus abondamment, si d'autres microbes (qui périssent à 80 degrés, selon notre expérience) ne gênaient leur développement.

Par conséquent, les rapports des espèces dans le gros intestin du cheval sont déterminés par la même loi générale qui détermine les rapports entre les espèces de la flore ou de la faune de quelque région ou de quelque contrée, — par la loi de la lutte pour l'existence.

Si le *b. coli*, l'entérocoque et le streptocoque sont les espèces dominantes dans le gros intestin du cheval, il est très vraisemblable que ce sont eux surtout qui empêchent le développement des autres microbes. Comme le *b. coli*, le streptocoque et l'entérocoque ne forment pas de spores et sont détruits par le chauffage; cette supposition se trouve en accord parfait avec les résultats des cultures dans le liquide intestinal, chauffé et non chauffé.

Metchnikoff [64] a depuis longtemps exprimé l'idée que les rapports entre les germes intestinaux sont déterminés par les conditions de la lutte pour l'existence, et qu'il pourrait se trouver, dans l'intestin, des microbes qui empêcheraient le développement d'autres microbes. Il a, lui aussi, isolé certains microbes capables d'empêcher le développement du vibron du choléra.

Tissier considère que le *b. bifidus*, qui domine dans la flore intestinale des nourrissons, est capable d'empêcher le développement des autres espèces.

A quel degré cette capacité d'empêcher le développement

est-elle propre aux trois espèces dominantes citées? Sur le *b. coli*, nous possédons un grand nombre d'indications, qui malheureusement sont encore contradictoires. Depuis longtemps, Bienstock [65 et 66] avait exprimé la supposition que le *b. coli* est capable d'empêcher la putréfaction. Escherich admet également que le *b. coli* peut empêcher le développement d'autres microbes. Quant à la cause de cette action du *b. coli*, Tissier et Marthely [18], Passini [67] considèrent que le *coli* peut empêcher le développement des autres microbes dans un milieu contenant des hydrates de carbone, grâce à l'acide qu'il produit par la décomposition de ces derniers.

D'autre part, quelques autres auteurs (Eijkmann [69], Konradi et Kurpjuweit [70], Moro et Murath [68]), considèrent que le *coli* est capable de produire un corps thermolabile qui arrête non seulement son propre développement, mais aussi celui de quelques autres microbes. Mauteufel [71] nie l'existence d'un pareil produit. Bien entendu, cette action exercée par n'importe quel microbe dépend de la composition du milieu et des microbes sur lesquels elle doit s'exercer. Pour répondre à la question posée ci-dessus, nous devons élucider si le *b. coli*, le streptocoque et l'entérocoque,ensemencés dans le liquide intestinal du cheval, peuvent empêcher le développement des autres microbes qui s'y trouvent.

Dans le tube avec contenu intestinal chauffé, j'ai ajouté le *b. coli*, l'entérocoque et le streptocoque, et ensuite, comme dans les cas précédents, j'ai suivi le développement de nouvelles espèces bactériennes. Les résultats obtenus étaient vérifiés par comparaison avec des tubes de contrôle. J'ai observé que le *b. coli* peut arrêter le développement d'autres microbes et que parfois, dans les tubes avec le contenu intestinal chauffé et additionné du *b. coli*, le développement des nouvelles espèces bactériennes est plus lent que dans les tubes avec le contenu intestinal non chauffé.

Pour obtenir ce résultat, il est nécessaire d'ajouter deux ou trois cultures de 24 heures du *b. coli* pour 20 cent. cubes de liquide intestinal. La réaction de ce liquide, avec ou sans le *b. coli*, restait toujours neutre ou faiblement alcaline.

Cette action entravante du *b. coli* n'a jamais été absolue et la différence dans le développement des nouvelles formes bacté-



riennes entre les tubes contenant le *b. coli* et les tubes ne le contenant pas disparaissait au bout de quelques jours.

Les expériences correspondantes, faites avec le streptocoque et l'entérocoque n'ont pas donné de résultats concluants. Cela peut s'expliquer, peut-être, par la lenteur relative du développement du streptocoque et de l'entérocoque, qui permet aux autres microbes contenus de se développer avant que l'entérocoque et le streptocoque aient pu exercer leur action.

Il n'y a donc rien d'in vraisemblable dans la supposition que, dans le gros intestin du cheval, où existe de longue date la prédominance quantitative du *b. coli*, de l'entérocoque et du streptocoque, non seulement le *b. coli*, mais aussi le streptocoque et l'entérocoque, exercent l'action empêchante sur les autres microbes. Il est possible qu'il se trouve encore d'autres microbes capables de la même action, très vraisemblablement des microbes acidophiles. Cependant, comme ces derniers sont en très petite quantité, il est douteux que leur action empêchante ait une grande puissance.

Cette action empêchante n'est pas absolue et ne dure pas longtemps, et nous savons déjà que dans le contenu intestinal non chauffé du cheval, et conservé dans des tubes stérilisés, il se produit aussi le développement de nouvelles espèces bactériennes, quoique plus lentement que dans les tubes avec contenu intestinal chauffé. Par conséquent, le temps pendant lequel les masses alimentaires séjournent dans le gros intestin agit sur la composition de la flore intestinale : si, dans les conditions normales, le *b. coli*, le streptocoque et l'entérocoque gardent la prédominance, cela provient de ce que les masses alimentaires sont évacuées au dehors bien avant que la quantité infinie des autres espèces puisse surmonter l'action des espèces dominantes.

Il existe donc une certaine corrélation harmonique entre la composition des aliments, la structure du gros intestin et la composition de la flore intestinale du cheval, et cette corrélation est avantageuse au cheval.

En effet, il s'amasse dans le gros intestin du cheval une grande quantité de matières alimentaires qui contiennent des microbes tels que le *b. Welchii*, le *b. putrificus*, le *b. sporogenes*, le *b. tetani*, etc. : et si tous ces microbes, se développant

sans entrave, atteignaient la limite indiquée par la composition chimique du contenu intestinal, il est évident, que l'hôte serait constamment intoxiqué par la grande quantité de produits toxiques dégagés, sa vie normale serait impossible. De plus, on rencontre constamment dans l'intestin du cheval des agents de la fermentation de la cellulose, de l'hémicellulose et de l'amidon. Pendant la fermentation de ces matières, il se forme des acides gras et beaucoup de gaz, ce qui, comme nous l'avons dit plus haut, présente un danger assez considérable pour les chevaux. C'est donc également une condition indispensable de vie normale, que l'arrêt de développement des agents de la fermentation des matières déjà citées.

Le fait que chaque microbe (à l'exception du *b. coli*, de l'entérocoque et du streptocoque) qui pénètre dans le gros intestin du cheval dans des conditions normales ne se développe que très lentement corrige dans une certaine mesure le développement exagéré du gros intestin. En poussant plus loin cette idée, nous pouvons dire que les facteurs de la sélection naturelle, qui ont amené le cheval à ce développement exagéré du gros intestin, n'auraient pu manifester leur action, si, dans les conditions données d'alimentation, les rapports mutuels des espèces du gros intestin ne garantissaient pas la pauvreté relative de la flore intestinale.

D'ailleurs, l'accord entre la composition de la flore intestinale et la structure du gros intestin, qui est une création inconsciente de la nature, en vue de la conservation de l'espèce, ne manque pas de défauts essentiels quand il ne s'agit que de l'existence et de la santé de l'individu. Bien que le développement des microbes nuisibles qui pénètrent dans le gros intestin du cheval rencontre des obstacles, l'obstacle n'est pas absolu, et les microbes nuisibles peuvent se développer dans de certaines limites, formant les produits toxiques qui leur sont propres.

Le danger n'est pas supprimé; l'intoxication aiguë est remplacée par l'intoxication chronique, d'autant que les espèces dominantes elles-mêmes peuvent à peine être considérées comme inoffensives, si l'on envisage particulièrement le *b. coli* (Metchnikoff).

Enfin, l'action empêchante porte sur tous les microbes en

général qui pénètrent dans le gros intestin; non seulement sur les microbes nuisibles ou indifférents, mais aussi sur ceux qui, comme les acidophiles, pourraient être plus utiles que le *b. coli*, le streptocoque et l'entérocoque.

Ceci accentue encore une fois la nécessité de remplacer la flore intestinale « sauvage » par une flore « cultivée », c'est-à-dire de résoudre le problème qu'est pour Metchnikoff le but final de l'étude de la flore intestinale.

En terminant, je me fais un agréable devoir d'exprimer ma profonde reconnaissance à M. Metchnikoff qui a eu la bienveillance de m'offrir ce sujet d'étude et de m'avoir guidé dans l'exécution de ce travail.

Je remercie MM. Burnet, A. Besredka et Weinberg d'avoir cherché à me le faciliter.

10 avril 1910.

\*  
\* \*

Mon travail était déjà terminé quand furent publiées les recherches de M. Huber (1) sur la flore intestinale du cheval. Ces recherches avaient été entreprises dans un autre but et avec des méthodes différentes des miennes.

L'auteur a trouvé que, dans l'intestin du cheval, on rencontre constamment des microcoques, des sarcines, des streptocoques, des *b. coli*, des microbes de l'eau, qui liquéfient la gélatine. Il a isolé des microbes qui se rapprochent du groupe paratyphique B, mais qui s'en distinguent par certaines propriétés.

Il n'a pas pu isoler les microbes acidophiles, ce qui s'explique par le fait que, pour favoriser le développement des microbes acidophiles dans les cultures, il s'était servi de bouillon ordinaire additionné de 1 p. 100 d'acide acétique; or, les microbes acidophiles ne se développent pas dans ce milieu.

Finalement, Huber a trouvé un microbe anaérobie, qui lui paraît ressembler au *b. putrificus*, mais il n'a pas pu constater

(1) HUBER. *Beiträge zur Bakteriologie des normalen Pferdedarmes mit besonderer Berücksichtigung der Bakterien der Coli-Typhus Gruppe*. Dissertation, 1910.

chez ce microbe la formation de spores, et n'a pas établi non plus comment ce microbe se comporte vis-à-vis du blanc d'œuf et de la gélatine.

## BIBLIOGRAPHIE

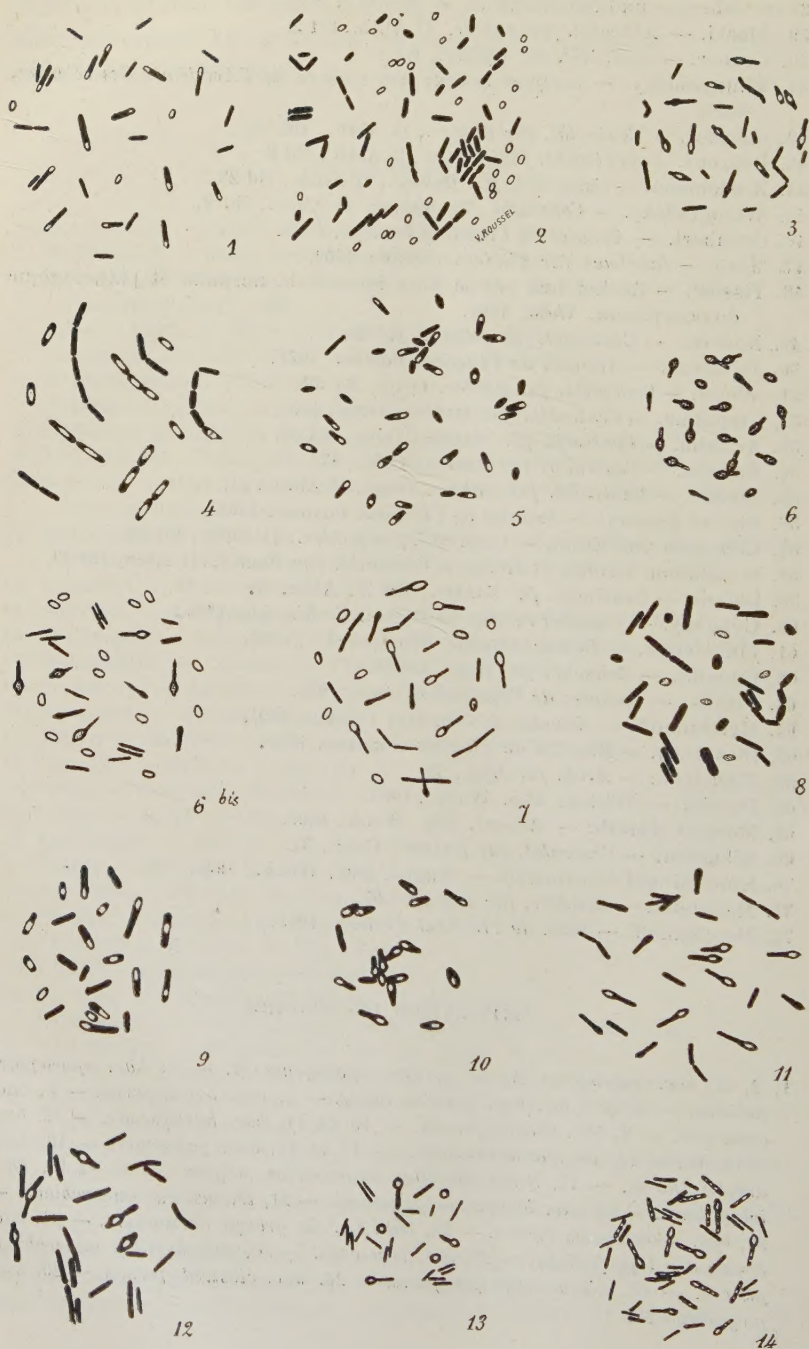
1. Metchnikoff. — *Essais sur la nature humaine*, 1903.
2. Metchnikoff. — *Essais optimistes*, 1907.
3. Metchnikoff. Weinberg, Pozersky, Distaso, Berthelot. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909.
4. Dyar et Keith. — *Centr. f. Bakter.*, 16, 1894. Refer.
5. Baruchello. — *Centralbl. f. Bakter.*, Orig., 39, 1905.
6. Meregekowsky. — *Centralbl. f. Bakter.*, Orig., 39.
7. Schaner et Veillon. — *Semaine médicale*, 1890.
8. Hoffmann, Sormani et Molinari. — *Hygienische Rundschau*, 1905.
9. Ankerschmit. — *Centralbl. für Bakter.*, Bd 39 et 40. Orig., 1905.
10. Nebayer. — *Archiv für wissensch. und prakt. Tierheilk.*, Bd 31, cité d'après *Baumgarten's Jahresber.*
11. Huttemann. — *Beiträge zur Kenntniss der Bakterienflora in normalen Darmtraktus des Kindes*, 1905, cité d'après *Baumgarten's Jahresber.*
12. Uhlenhut. — *Medizinische Klinik*, 1908.
13. Andreeff. — *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt*, 1909.
14. K. Joseph. — *Zeitschr. für Infektionskrank. der Haustiere*, Bd 7, 1910.
15. Metchnikoff. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908.
16. Bienstock. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1896.
17. Bienstock. — *Archiv f. Hyg.*, 36.
18. Tissier et Marthely. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902.
19. Lüderitz. — *Zeitsch. f. Hyg.*, Bd 5.
20. Klein. — *Centralbl. für Bakter.*, Bd 18, 25, 26.
21. Salus. — *Archiv für Hyg.*, 51.
22. Kedrowsky. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 15.
23. Botkin. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 11.
24. Sanfelice. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 17.
25. Flugge. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 17.
26. Liborius. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 1.
27. Flügge. — *Die Mikroorganismen*, 1896.
28. Severin. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 1.
29. Omeliansky. — *Archives des sciences biologiques*, vol. VII et IX.
30. Van Ijerson. — *Centralbl. für Bakter.*, Abth. II, Bd 11.
31. Trecul. — *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences*, vol. LXI.
32. Van Tieghem. — *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences*, vol. LXXXVIII et LXXXIX.
33. Behrens. — *Die Pektin gärung*, dans *Handbuch der technischen Mykologic*, Bd 3.
34. Omeliansky. — *Die Cellulosegärung*, dans *Handbuch der technischen Mykologie*, Bd 3.
35. Grasberger und Schattenfroh. — *Arch. für Hyg.*, Bd 37.
36. Grasberger und Schattenfroh. — *Archiv für Hyg.*, 48.
37. Beijerinck, cité d'après Baier. — *Centralbl. f. Bakter.*, II Abth., Bd 1.

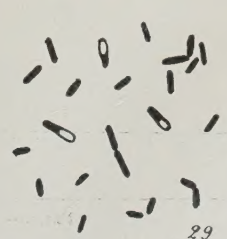
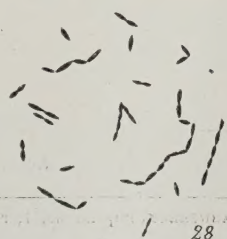
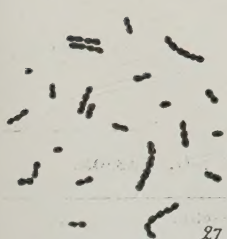
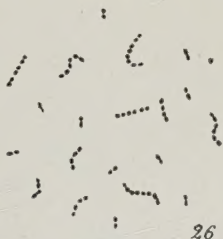
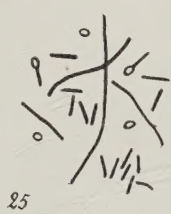
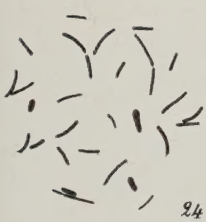
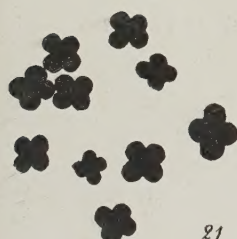
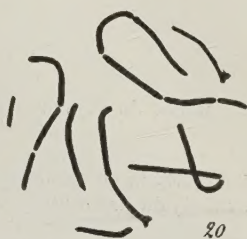
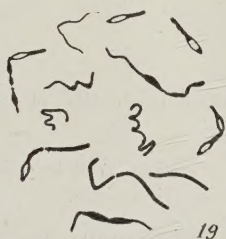
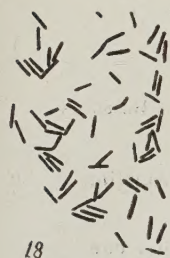
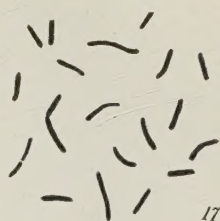
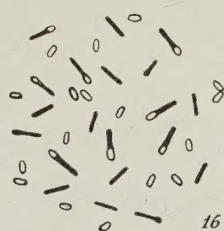
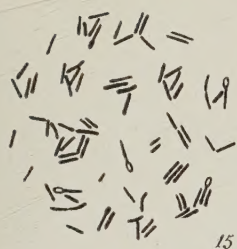


38. Grasberger und Schattenfroh. — *Archiv f. Hyg.*, 42.
39. Klecki. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 2.
40. Gruber. — *Centralbl. für Bakter.*, Bd 1.
41. Winogradsky. — *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences*, 1893.
42. Stormer. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 13.
43. Behrens. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 8.
44. Bredemann. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 23.
45. Winogradsky. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 9.
46. Grimbert. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1893.
47. Moro. — *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 1900.
48. Tissier. — *Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson. Thèse*, 1901.
49. Rodella. — *Centralbl. für Bakter.*, Bd 29.
50. Jacobson. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908.
51. Weiss. — *Centralbl. für Bakter. Orig.*, Bd 36.
52. Cippolina. — *Centralbl. für Bakter.*, Orig., 1902.
53. A. Cahn. — *Centralbl. für Bakter.*, Orig., Bd 30.
54. Rodella. — *Centralbl. für Bakter.*, Orig., 47.
55. Kuntze. — *Centralbl. für Bakter.*, Orig., II Abth., 21.
56. Rist et Knoury. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902.
57. Louersen und Khun. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 20.
58. Weigmann, Gruber et Hess. — *Centralbl. für Bakter.*, II Abth., Bd 19.
59. Lohnis. — *Centralbl. für Bakter.*, Bd 18, Abth. II.
60. Cohendy. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1906.
61. Finkelstein. — *Deutsche medic. Wochenschr.*, 1900.
62. Rodella. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 39.
63. Tissier. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1908.
64. Metchnikoff. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.
65. Bienstock. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900.
66. Bienstock. — *Arch. für Hyg.*, 39.
67. Passini. — *Wiener. klin. Woch.*, 1906.
68. Moro et Murath. — *Wiener. klin. Woch.*, 1906.
69. Eikmann. — *Centralbl. für Bakter.*, Orig., 37.
70. Konradi und Kupriuwit. — *Münch. med. Woch.*, 1905.
71. Manteufel. — *Zeitschr. für Hyg.*, Bd 57.
72. Metchnikoff. — *Bull. de l'Institut Pasteur*, 1903.

## EXPLICATION DES FIGURES

- 1, 2, 3, *bac. sporogenes A.* — 4, *bac. sporogenes B.* — 5, *bac. sporogenes foetidus.* — 6 et 6 bis, *bac. foetidus albus.* — 7, *bac. botriosporus.* — 8, *bac. dessicans.* — 9, *bac. arachniformis.* — 10 et 11, *bac. hastiformis.* — 12, *bac. Sewerin.* — 13, *bac. annulosporus.* — 14 et 15, *bac. gasogenes.* — 16, *bac. amyolythicus.* — 17, *Streptobacillus anaerobicus magnus.* — 18 et 19, *bac. irregularis.* — 20, *bac. bifurcatus gasogenes.* — 21, *tetracoccus anaerobicus.* — 22, *bac. anaerobicus rectus.* — 23, *bac. B.*, du groupe de Rodella. — 24, *bac. tenuis non liquefaciens.* — 25, *bac. roscens.* — 26, *coccobacillus anaerobicus parvus.* — 27, *micrococcus gasogenes.* — 28, *bac. clostridieformis.* — 29, *bac. megalosporus.*







## ERRATA

Numéro du 25 mars 1911. Mémoire de MM. METCHNIKOFF et BESREDKA.

Page 198, ligne 7, supprimer le renvoi (1) et le point d'interrogation (?). Le renvoi (1) du bas de la page se trouve annulé.

Même page, ligne 14, le renvoi (2) se trouve devenir (1) et par conséquent le renvoi (2) du bas de la page devient (1).

Page 200, ligne 3 du petit texte, *au lieu de* i sur boîte de Petri, *lire* : *sur boîte de Roux*.

---

*Le Gérant* : G. MASSON.

---

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.